

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Gezielte molekulare Therapie des Mantelzelllymphoms -
Differentielle Regulierungsmuster der Anti-CD20-Antikörper
Obinutuzumab und Rituximab**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniel Alexander Heinrich
aus der
Freien Hansestadt Bremen

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dreyling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karl Sotlar

Priv. Doz. Dr. med. Irene Schmid

Prof. Dr. Dr. Fuat Oduncu

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. hum. biol. Marc Weinkauff

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2016

Danksagung

Ich danke Professor Dr. med. Martin Dreyling für sein vollstes Vertrauen als Mentor und seine Unterstützung bei der Planung, Durchführung, Auswertung und Publikation dieser Arbeit. Es war mir eine große Freude und Ehre von ihm gelernt und mit ihm gemeinsam geforscht zu haben.

Die AG Dreyling, mit ihren hervorragenden Mitgliedern, war das Fundament für das Gelingen dieser Experimente. Ich möchte mich für die herzliche, kollegiale und motivierende Zusammenarbeit bei Dr. Grit Hutter, Yvonne Zimmermann, meiner Mitdoktorandin Kristina Decheva, meinen Vorgängern Dr. Alina Postnikova und Dr. Tobias Weiglein, sowie ganz besonders bei meinem direkten Betreuer Dr. Marc Weinkauff bedanken.

Ich bedanke mich für die Hilfe und Unterstützung von Dr. Christian Klein und Dr. Helmut Burtscher von Roche Glycart, Penzberg.

Diese Doktorarbeit widme ich den Menschen, die mich in diesen Jahren voller Kraft unterstützt und geliebt haben – meinen Eltern Dr. Rodica und Dr. Reuven Heinrich.

1 Inhaltsverzeichnis

2 Einführung6

2.1	Das Mantelzelllymphom	6
2.1.1	Zahlen und Fakten zur Epidemiologie.....	6
2.1.2	Herkunft der Zellen	6
2.1.3	Zellmorphologie.....	7
2.1.4	Immunophänotyp.....	8
2.1.5	Pathogenese: zyto- und molekulargenetische Grundlagen	9
2.2	Risikofaktoren, Klinik, Diagnose und Therapie des Mantelzelllymphoms	14
2.2.1	Potentielle Risikofaktoren.....	14
2.2.2	Klinische Präsentation.....	15
2.2.3	Diagnose und Staging	16
2.2.4	Prognose und Therapie	18
2.3	Anti-CD20-Antikörper	23
2.3.1	Das CD20-Molekül	23
2.3.2	Überblick und Wirkmechanismen der Antikörper	23
2.3.3	Rituximab	26
2.3.4	Obinutuzumab (GA101).....	26

3 Fragestellung der Arbeit.....29

4 Material und Methoden30

4.1	Material	30
4.1.1	Zelllinien.....	30
4.1.2	Monoklonale Antikörper.....	31
4.1.3	Puffer, Antibiotika und Lösungen	31
4.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	32
4.1.5	Verwendete Geräte	32
4.1.6	Verwendete Software	32
4.2	Methoden	33
4.2.1	Zellkulturbedingungen	33
4.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellreihen.....	33
4.2.3	Viabilitätsbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlusstest.....	34
4.2.4	Viabilitätsbestimmung mittels Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer.....	34
4.2.5	Mono- und Kombinationstherapien.....	36
4.2.6	Fraction of Product – Berechnung	37
4.2.7	Expressionsanalyse durch Affymetrix®-Microarray	38

5	Ergebnisse	40
5.1	Viabilitätsbestimmung mittels Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer	40
5.1.1	Dosisfindungsexperimente: Obinutuzumab (GA101)	40
5.1.2	Dosisfindung: Rituximab	42
5.1.3	Mono- und Kombinationsergebnisse der Antikörpertherapie	42
5.1.4	Kombinationsergebnisse der Antikörpertherapie: simultane vs. sequentielle Behandlung	45
5.2	Microarray-Analysen	48
5.2.1	Deregulierte Gene der Obinutuzumab- und Rituximab-Monotherapien	48
5.2.2	Vergleich der Transkriptionsveränderungen beider mAk	48
5.2.3	Gemeinsam deregulierte Gene der Monotherapien	49
5.2.4	Ausschließlich nach Obinutuzumab-Monotherapie deregulierte Gene	52
5.2.5	Ausschließlich nach Rituximab-Monotherapie deregulierte Gene	54
5.2.6	Deregulierte Gene der Kombinationstherapie	57
5.2.7	Zelllinienspezifischer Vergleich nach den Monotherapien	60
6	Diskussion	65
6.1	Obinutuzumab und Rituximab: gemeinsame Signalwege	65
6.2	Obinutuzumab Mono-Behandlung: deregulierte Transduktionswege und mögliche Wirkmechanismen	67
6.3	Rituximab Mono-Behandlung: deregulierte Transduktionswege und mögliche Wirkmechanismen	70
6.4	Rituximab plus Obinutuzumab: Kombinationsexperimente	71
7	Zusammenfassung	73
8	Literaturverzeichnis	74
9	Abkürzungsverzeichnis	96

2 Einführung

2.1 Das Mantelzelllymphom

2.1.1 Zahlen und Fakten zur Epidemiologie

Das Mantelzelllymphom (MZL) ist ein aggressives B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL), welches durch eine schlechte Langzeitprognose mit einem medianen Überleben von 4-6 Jahren charakterisiert wird. Bis zu 6% aller NHL in Europa und den USA sind Mantelzelllymphome, bei einer steigenden Inzidenz von ungefähr 0,4-0,55 pro 100.000 Personenjahre und einem medianen Diagnosealter von 74 Jahren (Dreyling and Hiddemann 2009, Morton, *et al* 2006, Smith, *et al* 2011, Zhou, *et al* 2008).

2.1.2 Herkunft der Zellen

Das MZL wurde zunächst als Mantelzonen-Lymphom, zentrozytisches Lymphom oder intermediäres lymphozytisches Lymphom in der Literatur beschrieben (Bodrug, *et al* 1994, Jiang, *et al* 1993). Die Kiel-Klassifikation definierte die Krankheit zunächst als zentrozytisches Lymphom, aufgrund der morphologischen Gleichartigkeit zu den Zentrozyten der Germinalzone (Lennert, *et al* 1975). Es wird angenommen, dass die meisten MZL-Fälle von naiven Vorläufer-B-Zellen ausgehen, die der Mantelzone entstammen und dem Keimzentrum noch nicht ausgesetzt waren (Banks, *et al* 1992). Weitere Varianten würden aus der Marginalzone oder den B-Gedächtniszellen des peripheren Blutes entspringen. Als Hinweis darauf, dass sich die Zellen des MZLs von naiven B-Zellen herleiten, lässt sich das Fehlen von somatischen Mutationen der Gene, die die variablen Regionen der schweren Ketten der Immunglobuline (IgVH) kodieren, deuten. Diese werden als Leitbefund des Durchlaufens der Germinalzone bewertet (Bertoni, *et al* 2004a, Walsh, *et al* 2003). Jedoch konnten weitere Experimente zeigen, dass auch MZL-Fälle mit somatischen Hyper-

mutationen existieren, welche auf eine Keimzellenexposition hinweisen. Somit könnten diese MZL-Fälle von Marginalzonen- oder B-Gedächtniszellen aus dem peripheren Blut stammen (Camacho, *et al* 2003, Kienle, *et al* 2003, Walsh, *et al* 2003).

2.1.3 Zellmorphologie

Tolksdorf *et al.* beschrieben das MZL auf Basis zytomorphologischer Eigenschaften. Die später als *klassisch* beschriebene Variante gleicht morphologisch den Zentrozyten (Tolksdorf, *et al* 1980). Im Laufe der Jahre wurden weitere Varianten beschrieben. Der *kleinzellige* Typ mit dichtem Kernchromatin ähnelt den Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL). Sie wird gehäuft bei indolenten, leukämischen Verlaufsformen und Milzbefall ohne Lymphknoten-Beteiligung gesehen (Campo, *et al* 1999, Decaudin, *et al* 1997, Orchard, *et al* 2003, Weisenburger and Armitage 1996). Der *pleomorphe* Typ hat Zellen, welche denen des großzelligen B-Zell-Lymphoms ähneln (Campo, *et al* 1999, Zucca, *et al* 1994). Der *blastoide* Typ imitiert mit seinen kleinen bis mittelgroßen Blasten, lymphoblastische Lymphome oder eine akute lymphatische Leukämie. Es hat im Vergleich zum *klassischen* Typ einen erhöhten mitotischen Index (mitotische Figuren/mm²) und höhere Ki-67 Proliferationsindexwerte (Laszlo and Matolcsy 1999, Ott, *et al* 1998, Ott, *et al* 1997). Zwei weitere Subtypen mit zytomorphologischen Überlappungen können differenziert werden: der *klassisch + pleomorphe* Typ und der *klassisch/pleomorphe* Typ (Tiemann, *et al* 2005). Die blastoide Variante wurde bereits früh mit einem aggressiveren klinischen Verlauf assoziiert (Bosch, *et al* 1998, Lardelli, *et al* 1990). Jedoch konnte man beim Vergleich des *klassischen* und *kleinzelligen* Typs mit dem *blastoiden* bzw. *pleomorphen* Subtyps keinen Unterschied im Gesamtüberleben aufzeigen. Des Weiteren zeigten die Analysen, dass der Großteil der MZL-Fälle dem klassischen Typ zugeordnet werden muss und dass die Differenzierung der verschiedenen Subtypen kei-

nen prognostischen Wert hat. Sie diene hauptsächlich der Differenzierung zu anderen Neoplasien (Tiemann, *et al* 2005). Andere Ergebnisse weisen jedoch daraufhin, dass die *blastoiden* Varianten ebenfalls mit einem geringeren Gesamtüberleben assoziiert seien (Bernard, *et al* 2001, Campo, *et al* 2011). Zur Prognose des klinischen Verlaufs des MZL werden nun jedoch der Proliferationsindex Ki-67 und der mitotische Index eingesetzt (Bosch, *et al* 1998, Katzenberger, *et al* 2006, Pinyol, *et al* 1998). Das MZL kann entweder in der Mantelzone, nodal oder diffus wachsen (Pittaluga, *et al* 1995, Weisenburger, *et al* 1981). Allgemein wird davon ausgegangen, dass diese Wachstumsarten mit dem klinischen Progress der Grunderkrankung und dem Gesamtüberleben assoziiert werden können. So kommt es sukzessive zur Ausbreitung von der Mantelzone in den gesamten Lymphknoten und abschließend zum diffusen Wachstum (Majlis, *et al* 1997). Das Wachstumsmuster könne als prognostischer Marker betrachtet und nodales Wachstum mit einem längeren medianen Überleben assoziiert werden (Tiemann, *et al* 2005).

2.1.4 Immunophänotyp

Das MZL wird durch die hohe Expression der Oberflächenimmunglobuline IgM und/oder IgD, sowie einer Lambda-Leichtkettenrestriktion charakterisiert (Bertoni, *et al* 2004b). Die Zellen exprimieren die Pan-B-Zellmarker CD19, CD20, CD22, CD79a und CD79b, sowie CD5, CD43 und FMC7. Des Weiteren sind sie in den meisten Fällen, im Gegensatz zum follikulären Lymphom, negativ für CD3, CD11c, CD10, CD23 und BCL-6. Durch die Expression von CD5 und Negativität von CD23 lässt sich das MZL von der B-CLL differenzieren (Williams and Densmore 2005). In seltenen Fällen, die gehäuft mit blastoiden oder pleomorphen Varianten in Verbindung gebracht werden, sind die MZL-Zellen negativ für CD5 oder positiv für CD10, BCL-6

und MUM1 oder den T-Zellmarkern CD8 und CD7 (Gao, *et al* 2009, Gualco, *et al* 2010).

2.1.5 Pathogenese: zyto- und molekulargenetische Grundlagen

Trotz einer hohen histologischen Variabilität sind die meisten Fälle des MZL durch die Translokation t(11;14)(q13;q32) definiert, welche zu der Überexpression von Cyclin D1 führt (Campo, *et al* 2011). Cyclin D1, welches auch unter den früheren Bezeichnungen BCL1 (breakage cluster of lymphoma 1) und PRAD1 (parathyroid adenoma 1) bekannt ist, wird jedoch nicht in normalen B-Lymphozyten exprimiert. Es bedingt die Transition des Zellzyklus von der G1 zur S-Phase und somit die Proliferation (Motokura, *et al* 1991, Rosenberg, *et al* 1991). Cyclin D1 bindet an die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4, CDK6), was zu einer Phosphorylierung und konsekutiven Inaktivierung des Retinoblastom-Proteins 1 (RB1) führt, welches zum Teil für die Inhibition der Zellzyklusprogression in normalen Zellen verantwortlich gemacht wird (Matsushime, *et al* 1994, Meyerson and Harlow 1994, Mittnacht, *et al* 1994). RB1 bedingt normalerweise eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F, welcher wiederum durch die Beeinflussung verschiedener Gene, u.a. Cyclin E, für den Übergang einer Zelle in die S-Phase und die Replikation der Desoxyribonukleinsäure (DNS) nötig ist (Harbour and Dean 2000). Durch die Phosphorylierung von RB1 durch den Cyclin D1/CDK4-6-Komplex kommt es zur Freisetzung von E2F-Faktoren, welche wiederum eine Anreicherung des Cyclin E/CDK2 Komplexes bewirken. Hierdurch kommt es zu einer irreversiblen Inaktivierung von RB1 und dem damit verbundenen Übergang in die S-Phase. Nebenbei kommt es zu einer Bindung des Cyclin D1/CDK4-6-Komplex mit dem natürlichen CDK-Inhibitor p27Kip1, wodurch p27 sequestriert und dadurch daran gehindert wird inhibierend auf das Zellwachstum einzuwirken (Quintanilla-Martinez, *et al* 2003). Aufgrund dieser Er-

kenntnisse beschäftigt sich der größte Anteil der molekularen Forschung am MZL mit der Entschlüsselung von weiteren Zellzyklus-Mechanismen (Fernandez, *et al* 2005, Perez-Galan, *et al* 2011).

Die Hochregulierung von Cyclin D1 kann auf diverse Mechanismen zurückgeführt werden. Dazu gehört die Translokation t(11;14)(q13;q32), welche die DNS-Sequenz für die Kodierung von Cyclin D1 am Chromosom 11q13 mit der Region der schweren Immunglobulinketten am Chromosom 14 verbindet (Harris, *et al* 1994, Raffeld and Jaffe 1991). So konnte gezeigt werden, dass diese Translokation durch die RAG- (recombinase-activating genes) Rekombinase als auch durch die Cytidin-Deaminase (AID, activation-induced cytidine deaminase) vermittelte Induktion von Doppelstrangbrüchen induziert wird (Lenz and Staudt 2010). Neuere Experimente zeigten, dass sich das translozierte Allel des Cyclin D1-Gens in einer perinukleolären Region mit RNA Polymerase II Clustern befindet. Des Weiteren befände sich in diesem Bereich der Transkriptionsfaktor Nucleolin, der spezifisch an Bindungsseiten im Cyclin D1 - Gen binden könnte. Somit käme es zu der transkriptionellen Aktivierung des entsprechenden Gens (Allinne, *et al* 2014). Ergänzend kann die Erhöhung von Cyclin D1 mRNA durch Punktmutationen und genomische Deletionen bedingt werden (Wiestner, *et al* 2007). Ferner hätten ungefähr 50% der MZL-Patienten eine Aktivierung des WNT-Signalweges, welcher eine Hochregulierung von Cyclin D1 vermittelt (Gelebart, *et al* 2008).

Jedoch werden auch Cyclin D1-negative Formen des MZL beschrieben. So komme es zu einer Hochregulierung von Cyclin D2 (CCND2) oder Cyclin D3 mit ähnlichen klinischen Verläufen (Fu, *et al* 2005, Rosenwald, *et al* 2003). So wurden eine Translokation des CCND2-Gens vom Chromosom 12p13 zum IgG-k-Locus am

Chromosom 2p12 oder eine Translokation t(2;14)(p24;q32) des *N-MYC*-Onkogens bei *blastoiden* MZL-Fällen identifiziert (Wlodarska, *et al* 2008).

Ergänzend zu den Veränderungen der Cycline D1, D2 und D3 spielen auch sekundäre chromosomale Veränderungen einen wichtigen Teil in der Pathogenese des MZL. Campo und Swerdlow *et al.* beschrieben unter anderem „gain-of-function“-Mutationen oder in 25% der MZL-Fälle Trisomien des Chromosoms 12. (Campo, *et al* 2011, Cortelazzo, *et al* 2012). Durch die Analyse von diversen chromosomalen Alterationen können sogar MZL-Fälle prognostisch unterteilt werden (Salaverria, *et al* 2007). Ein weiterer Pathomechanismus, der in diesem Zusammenhang zu erwähnen ist, ist die Deletion des INK 4a/ARF-Locus auf Chromosom 9p21. Es kodiert für die Tumorsuppressorgene p14 und p16, welche wie p27 durch die Bindung an Cyclin/CDK-Komplexe den Zellzyklus inhibieren. Diese Fälle sind mit einer *blastoiden* Histologie assoziiert worden (Pinyol, *et al* 1997, Rosenwald, *et al* 2003).

Die Hochregulierung des Transkriptionsfaktors SOX11 (SRY (sex determining region Y)-box 11) führt zu einer gesteigerten Zellproliferation. SOX11, ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der unter anderem bei der ZNS-Entwicklung beteiligt scheint. SOX11 wird in den meisten MZL-Fällen im Gegensatz zu anderen B-NHL oder ausgereiften B-Zellen überexprimiert (Ek, *et al* 2008). In einigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von SOX11 zu einem Block bei der Entwicklung maturer B-Zellen während der plasmatischen Differenzierung führt. Dies konnte sowohl für primäre Tumorzellen als auch im *in vitro* Modell dargestellt werden (Vegliante, *et al* 2013). Des Weiteren wurde dieser Transkriptionsfaktor als reliabler Biomarker des Cyclin D1-positiven und Cyclin D1-negativen MZL identifiziert (Mozos, *et al* 2009, Salaverria, *et al* 2013).

Zusätzlich zu den Zellzyklusmechanismen spielen die alterierten DNS-Reparatur- und Apoptose-Signalwege entscheidende Rollen in der Genese des MZL. So gehören Veränderungen bzw. Deletionen des Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Tumorsuppressorgens (11q22-q23) zu wegweisenden Befunden bei bis zu 50% aller MZL-Fälle. ATM spielt eine entscheidende Rolle bei der zellulären Antwort auf DNS-Schäden (Greiner, *et al* 2006). Mutationen in diesem Gen können zu chromosomaler Instabilität führen (Stilgenbauer, *et al* 2000). Auch Mutationen des p53 Gens (17p13) sind in MZL-Fällen (10–25%) nachgewiesen worden. Der Wildtyp des p53 Gens bedingt eine Induktion von Wachstumsinhibitionsmechanismen wie Apoptose oder Zellzyklusarrest. Durch die Mutation werden diese Signalwege gestört und es kommt zum Ausbleiben der inhibierenden Effekte, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Greiner, *et al* 2006, Greiner, *et al* 1996).

Des Weiteren weisen Microarray-Daten auf gesteigerte Zellüberlebensstrategien auf molekulargenetischer Ebene hin. Hierzu gehört die Deregulierung von *BCL-2* (B cell lymphoma 2). Dieses Gen scheint eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung der Apoptose-Induktion zu spielen. So konnten Menendez *et al* zeigen, dass 55% der untersuchten MZL-Fälle eine Überexpression von *BCL-2* hatten. Durch dieses Onkogen kommt es scheinbar zu einem verlängerten Zellüberleben (Menendez, *et al* 2004).

In den letzten Jahren zeigten weitere Untersuchungen verschiedene Signaltransduktionswege, die ebenfalls einen Teil bei der Tumorphiliferation oder bei anti-apoptotischen Mechanismen spielen. Diese Transduktionskaskaden beinhalten den Nuclear-Factor-kB (NF-kB) (Martinez, *et al* 2003, Pham, *et al* 2003), den B-Zell-Rezeptor (BZR) (Boyd, *et al* 2009, Rinaldi, *et al* 2006) und den PI-3 Kina-

se/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) (Cecconi, *et al* 2008, Dal Col, *et al* 2008) Transduktionsweg.

Die NF- κ B-Familie besteht aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die entscheidende Zellregulationsmechanismen zum Wachstum und Überleben beeinflussen und zur Entstehung von Lymphomen und anderer hämatologischer Malignome beitragen können (Baldwin 2001). Pham *et al.* konnten zeigen, dass NF- κ B in bestimmten MZL-Fällen und -Zelllinien konstitutiv aktiviert ist. So konnten Experimente mit dem Proteasom-Inhibitor PS-341 oder einem spezifischen pI-k-B-alpha Inhibitor, (BAY 11-7082), einen Zellzyklusarrest oder direkte Apoptose beim MZL einleiten (Pham, *et al* 2003). Beim MZL sind der klassische und der alternative NF- κ B-Signalweg aktiviert. Neuere Ergebnisse zeigen, dass eine Untergruppe von MZL-Fällen, die auf die BZR-Inhibitoren Ibrutinib und Sotrastaurin sensibel reagierten, eine vermehrte Aktivierung des klassischen BZR-vermittelten NF- κ B-Signalwegs zeigten. MZL-Zellen, die Mutationen verschiedener Gene im alternativen NF- κ B-Signalweg hatten (z.B. *TRAF2* oder *BIRC3*) und nicht auf Ibrutinib ansprachen, zeigten eine Abhängigkeit von der Proteinkinase NIK (mitogen-activated protein 3 kinase 14 oder auch MAP3K14) (Rahal, *et al* 2014).

Das MZL zeigt eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, welcher eine zentrale Rolle beim Zellüberleben, -wachstum und der Tumorgenese durch die Inaktivierung verschiedener Gene, unter anderem der *BCL-2*-Familie, spielt. So konnten Rudelius *et al.* an MZL-Zelllinien zeigen, dass eine Hochregulierung des PI3K/AKT-Signalwegs zu einer Induktion des NF- κ B- als auch des mTOR-Weges führt. Die daraus resultierende Abnahme von p53-Levels führt zu einem gesteigerten Zellüberleben. Sie konnten weiter zeigen, dass eine Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs zu einer Zellproliferationshemmung, einem G₁-Arrest und einem Verlust der Cyclin D1-

Expression führten (Rudelius, *et al* 2006, Song, *et al* 2005). Die Inhibition der Bruton-Kinase (BTK), welche den BZR-Signalweg mit der PI3K/AKT und der NF- κ B-Transduktion verbindet, konnte hervorragende klinische Daten beim MZL erzielen (Wang, *et al* 2013). Ansonsten wird das Zellüberleben auch BZR-abhängig über den FOXO1-Transkriptionsfaktor vermittelt (Rudelius, *et al* 2006).

Eine Vielzahl neuerer Substanzen zielt auf die Beeinflussung der oben genannten Signalwege ab. Eines dieser neuen Substanzen, Ibrutinib, ein BTK Inhibitor, welcher den BZR-Signalweg beeinflusst, hat erfolgsversprechende Effekte zeigen können (Parekh, *et al* 2011). Isoform-spezifische PI3K-Inhibitoren wie zum Beispiel Idelalisib haben eine *in vitro* Apoptose-Induktion bei verschiedenen B-Zell-Malignomen demonstrieren können (Lannutti, *et al* 2011).

2.2 Risikofaktoren, Klinik, Diagnose und Therapie des Mantelzelllymphoms

2.2.1 Potentielle Risikofaktoren

Aktuell gibt es keine Belege für die Existenz eindeutiger Risikofaktoren für das MZL. Eine „Case-Control“-Studie hat den Verdacht nahegelegt, dass eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* das Risiko am MZL zu erkranken erhöhen würde. Diese Annahme basieren auf serologischen Testungen und epidemiologischen Daten, nicht jedoch auf molekularen Methoden (Cortelazzo, *et al* 2012, Schollkopf, *et al* 2008). Bis auf mögliche Zusammenhänge mit bekannten Pestiziden, Herbiziden und Insektiziden bei arbeitsbedingter Exposition sind aktuell keine direkten Auslöser des MZL beschrieben worden (Muller, *et al* 2005). Einige wenige familiäre Häufungen mit frühem Krankheitsbeginn sind veröffentlicht worden (Tort, *et al* 2004).

2.2.2 Klinische Präsentation

Leider wird das MZL erst spät diagnostiziert, so dass sich die meisten Patienten bei Diagnose bereits in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befinden. So haben ca. 70% der Patienten eine disseminierte Erkrankung (Tiemann, *et al* 2005). Bei Diagnose sind sie in Aktivität und Selbstversorgung eingeschränkt, gemessen am Karnofsky-Index bei 70% (Karnofsky DA 1949, Velders, *et al* 1996). Bis zu 30% der Patienten haben B-Symptome (s. 2.2.3 Diagnose und Staging). Drei Viertel der Erkrankten hat initial eine Lymphadenopathie (LAP). Das restliche Viertel zeigt zu Beginn eine Form der extranodalen Infiltration. Ein extranodaler Befall zweier Organsysteme ist bei 30-50% zu beobachten (Argatoff, *et al* 1997). Dazu gehören die folgenden betroffenen Organsysteme (in Prozent der Fälle): Splenomegalie 45-60%, Hepatomegalie 35% (Zucca, *et al* 1994), Knochenmarksinfiltration (>60%) (Velders, *et al* 1996), peripheres Blut (13-77%), Waldeyer'scher Rachenring, Gastrointestinaler Trakt (Romaguera, *et al* 2003) und seltener Brust, Haut, Pleura und Orbita (Argatoff, *et al* 1997). Eine Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) ist selten (< 5%). Das Risiko steigt jedoch mit dem Progress der Erkrankung und wird häufiger bei der *blastoiden* Variante beobachtet (Ferrer, *et al* 2008). Eine generalisierte LAP ist das häufigste klinische Erscheinungsbild beim MZL. Jedoch ist eine isolierte Splenomegalie, ohne LAP, keine Seltenheit (Pittaluga, *et al* 1996). Ungefähr 10-15% der Erkrankten hat einen reinen extranodalen Befall (Bosch, *et al* 1998). Genomische und Genexpressionsanalysen konnten zeigen, dass diese Subtypen eine leukämische, indolente Verlaufsform annehmen und meistens durch ein langes Gesamtüberleben von 5-12 Jahren und einer SOX11-Negativität charakterisiert werden (Fernandez, *et al* 2010). Obwohl sich nur 15-30 % der Patienten aufgrund gastrointestinaler Probleme vorstellen, ist die Beteiligung des GI-Traktes auf histologischer

Ebene sehr hoch. So sei eine histologisch nachweisbare Infiltration des oberen GI-Trakts in 43% und des unteren GI-Trakts in 88% der Fälle nachweisbar gewesen (Romaguera, *et al* 2003). Die bisher aggressivste Form des MZL hat ein medianes Überleben von ca. 3 Monaten. Bei dieser blastoiden Variante sind komplexe chromosomale Aberrationen mit 8q24-Mutationen identifiziert worden (Viswanatha, *et al* 2000). Laborchemisch präsentieren sich die Patienten mit einer Tumoranämie (50%), erhöhten LDH-Werten (Laktatdehydrogenase) und β 2-Mikroglobulin-Werten im Serum. Nur 10-30% der Fälle gehen mit erhöhten monoklonalen Immunglobulinen einher (Bosch, *et al* 1998).

2.2.3 Diagnose und Staging

Die Diagnose des MZL kann anhand einer histologischen Beurteilung einer Lymphknotenbiopsie, einer anderen Gewebeprobe, des Knochenmarks oder des Blutes gestellt werden. Zusätzlich zur visuellen Beschreibung erfolgen weitere Nachweise. Als definierende chromosomale Aberration gilt die Translokation t(11;14)(q13;q32). In seltenen Fällen werden bei Cyclin D1-negativen Fällen Cyclin D2 und D3 nachgewiesen (Rosenwald, *et al* 2003). Der Transkriptionsfaktor *SOX11* wurde zuletzt als Diagnosemarker definiert, dessen Absenz für einen indolenten Verlauf spricht (Fernandez, *et al* 2010). Ergänzend zu diesen diagnosedefinierenden Alterationen, schließen sich weitere Staging-Untersuchungen an. Hierzu erfolgen die Bestimmung der LDH, eine Knochenmarksaspiration und -biopsie mit anschließender Immunophänotypisierung der gewonnenen Zellen mittels Flow-Zytometrie, sowie die Durchführung einer Ganzkörper-Computer-Tomographie (Thorax, Abdomen und Becken) (Vose 2013). Bezüglich der Durchführung einer FDG-PET ((¹⁸F)Fluor-desoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie) sind keine klaren Leitlinien definiert. Brepoels *et al.* beschreiben, dass die FDG-PET eine hohe Sensitivität bei der

Erkennung von Lymphknotenbeteiligung hat und bei der *blastoiden* Variante des MZL eine höhere FDG-Aufnahme zeigt (Brepoels, *et al* 2008). Jedoch ist die Sensitivität geringer bei Patienten mit extranodalem Befall. So sei ein Routineeinsatz auch nicht als Therapiekontrolle zu empfehlen, denn konventionelle CT-Untersuchungen hatten die gleiche Aussagkraft bezüglich der Einschätzung des Therapieerfolgs (Brepoels, *et al* 2008, Gill, *et al* 2008). Der Einsatz sei in weiteren Studien, insbesondere bei aggressiven MZL-Varianten bei denen das Ansprechen der Therapie als Endziel definiert würde, zu empfehlen (Cheson, *et al* 2007). Laut *American Journal of Hematology* wird jedoch ein Einsatz des FDG-PETs als sinnvoll eingeschätzt (Vose 2013). Des Weiteren wird die Durchführung einer Gastro- und Koloskopie bei Patienten mit gastrointestinalen Beschwerden empfohlen (Romaguera, *et al* 2003). Liquorpunktionen werden nur bei Patienten mit neurologischen Defiziten empfohlen (Ferrer, *et al* 2008). Das Staging-System beim MZL folgt der Ann-Arbor-Klassifikation der NHL. Anhand der Manifestationsorte werden Lymphome in insgesamt 4 Stadien eingeteilt. Ergänzend können die Stadien in „A“ oder „B“ eingeteilt werden. Bei Patienten mit systemischen Symptomen wie Fieber ohne erklärbaren Grund, regelmäßigen und starken Nachtschweiß sowie Gewichtsverlust über zehn Prozent des Körpergewichts innerhalb der letzten 6 Monate wird die Einteilung um ein „B“ ergänzt. Beim Nichtvorhandensein dieser Symptome wird ein „A“ angefügt. Die extranodalen Infiltrate werden nach ihrer Lokalisation bezeichnet: z.B. „O“ für Knochen, „L“ für Lunge. Mit „X“ bezeichnet man einen Herd von über 10 cm Durchmesser (Carbone, *et al* 1971).

2.2.4 Prognose und Therapie

Die Einleitung der Therapie des MZL hängt von der Stadieneinteilung und der damit verbundenen Prognose ab. Zur Einschätzung der Prognose wurde ein MZL-spezifischer Prognoseindex eingeführt. Der MIPI (**M**antle cell lymphoma **I**nternational **P**rognostic **I**ndex) wird durch vier unabhängige Prognosefaktoren definiert: Alter, LDH-Wert, Leukozytenzahl und „ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Performance Status“ (Hoster, *et al* 2008). Ein Wert unter 5,7 entspricht der Niedrig-Risiko-Gruppe, 5,7-6,2 der mittleren und über 6,2 der Hoch-Risiko-Gruppe. Die folgende Darstellung entstammt der Originalveröffentlichung von Hoster *et al.* (Hoster, *et al* 2008).

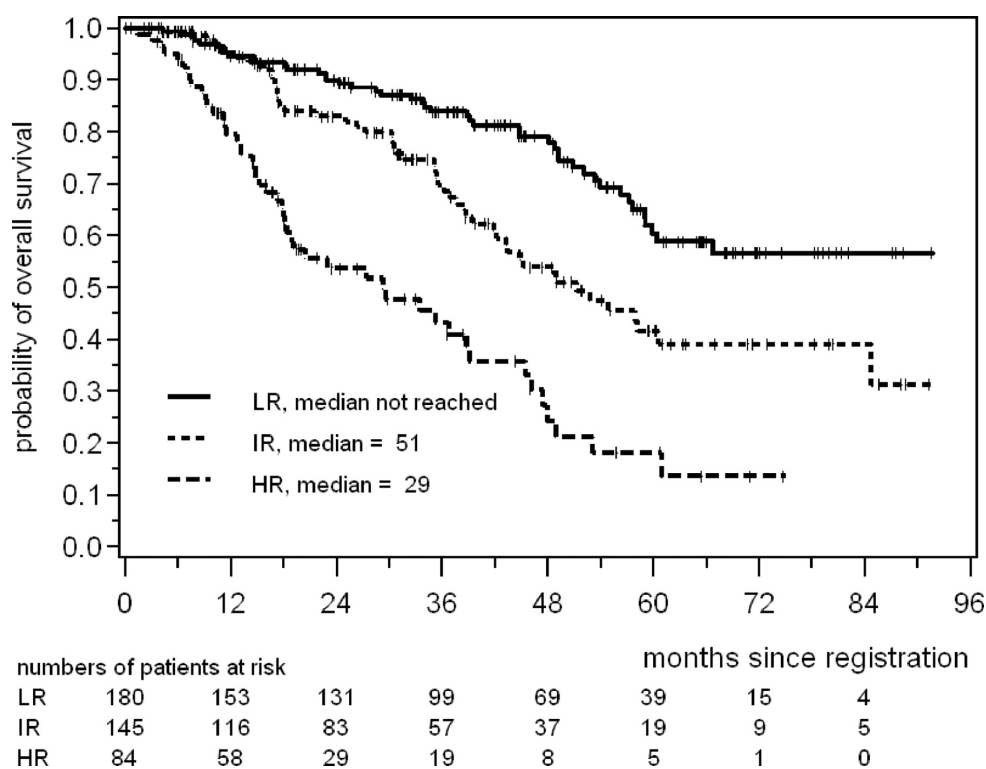


Abbildung 1: „Mantle cell lymphoma international prognostic index (MIPI)“ entnommen aus (Hoster, *et al* 2008)

Anhand des MIPI lassen sich Patienten in fortgeschrittenen Stadien (Stadium III-IV) in drei verschiedene Prognosegruppen einsortieren. Hiernach haben die Patienten

der Niedrig-Risiko-Gruppe (44% der Patienten) das mediane Gesamtüberleben während des Beobachtungszeitraums nicht erreicht. Die Gruppe mit dem mittleren Risiko (35% der Patienten) hatte ein medianes Gesamtüberleben von 51 Monaten, die Hoch-Risiko-Gruppe (21% der Patienten) nur noch 29 Monate (Hoster, *et al* 2008). Der MIPI wurde zuletzt auch anhand prospektiver Studien bestätigt und zeigte sich als signifikanter Prognosemarker bezüglich der Zeit bis zum Therapieversagen (TTF, time to therapy failure) (Hoster, *et al* 2014). Ein unterstützender Prognosemarker ist der Proliferationsindex Ki-67, welcher bei der Einschätzung der Risiko-adaptierten Therapieeinleitung helfen kann (Katzenberger, *et al* 2006). Jedoch sind die Ki-67-Messungen stark variabel, sodass eine einheitliche Methodik vorgeschlagen wurde (de Jong, *et al* 2007, Klapper, *et al* 2009).

Eine standardisierte Leitlinie zur Therapieeinleitung existiert nicht. Am MIPI orientierend ergeben sich folgende Therapieoptionen außerhalb von standardisierten klinischen Studien: Es besteht zum einen die Option einer konventionellen Immuno-Chemotherapie mit oder ohne Erhaltungstherapie (z.B. R-CHOP, R-CVP, R-Bendamustin), zum anderen die Option einer Induktionstherapie mittels Immuno-Chemotherapie, gefolgt von einer Hochdosis-Chemotherapie und einer autologen Stammzelltransplantation. Ein weiterer Ansatz ist der alleinige Einsatz einer Hochdosis-Immuno-Chemotherapie (z.B. R-Hyper-CVAD) (Cortelazzo, *et al* 2012, Vose 2013).

Wenige Patienten werden in einem frühen Stadium diagnostiziert. Für diese Patienten existiert ebenfalls kein Standardtherapievorgehen. So werden wenige Zyklen konventioneller Chemotherapie mit anschließender Radiotherapie beschrieben. Hierbei konnten langfristige Remissionen und Verbesserungen beim progressionsfreien Überleben (PFS) erzielt werden (Leitch, *et al* 2003) (Bernard, *et al* 2013). Ein

anderer Ansatz für Patienten mit niedrigem MIPI oder bei älteren asymptomatischen Patienten entspricht dem „watch and wait“-Verfahren, welches beim follikulären oder anderen indolenten Lymphomen eingesetzt wird (Martin, *et al* 2009, Vose 2013). Werden diese Patienten symptomatisch, ergibt sich eine potentielle Therapieindikation. Die „German Lymphoma Study Group“ konnte zeigen, dass eine Addition von Rituximab zum bewerten CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) ein verbessertes Ansprechen (ORR) und eine Verbesserung der Komplettremissionsrate (CR) bewirken konnte. Jedoch führten diese Ergebnisse nicht zu signifikanten Verbesserungen beim PFS oder beim Gesamtüberleben (OS) (Lenz, *et al* 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass R-CHOP ein verbessertes Gesamtüberleben gegenüber R-FC (Rituximab, Fludarabin, Cyclophosphamid) erzielte. In der Erhaltungstherapie mit Rituximab nach R-CHOP konnte ein signifikanter Vorteil bezüglich PFS und OS nachgewiesen werden (Kluin-Nelemans, *et al* 2012). In der Bright-Studie konnte die Nicht-Inferiorität einer Rituximab-Bendamustin-Therapie gegenüber der Standardtherapie mit R-CHOP oder R-CVP (Rituximab, Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison) gezeigt werden. Allerdings hatten die Patienten mehr Übelkeit und Medikamenten-assoziierte Hypersensitivitätsreaktionen unter R-Bendamustin. Die Standardtherapie erzeugte jedoch höhere Raten an peripheren Neuropathien sowie Alopezie (Flinn, *et al* 2014).

Bei Jüngeren Patienten (unter 65 Jahren) liegt der Schwerpunkt auf einer intensivierten Induktionstherapie. Erste randomisierte Studien zeigten bereits, dass Patienten, die nach Induktionstherapie eine autologe Stammzelltransplantation (ASCT) nach myeloablativer Radiochemotherapie anstelle von Interferonerhaltungstherapie erhielten, eine signifikante Verbesserung bezüglich PFS aufwiesen (Dreyling, *et al* 2005). Weitere Studien zeigten, dass der Einsatz von Rituximab in Kombination mit hyper-

fraktioniertem Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason abwechselnd eingesetzt mit Hochdosis Cytrabin und Methotrexat ein 7-Jahres-OS von 68% erreichen konnte (Romaguera, *et al* 2005). Jedoch ist aufgrund der hochgradigen Toxizität die Durchführung dieses Therapieregimes an nicht-spezialisierten Zentren erschwert (Bernstein, *et al* 2013). Die Durchführung einer ASCT nach erfolgter kompletter Remission wurde in einer Retrospektivstudie untersucht. Die jungen Patienten erhielten R-Hyper-CVAD oder R-CHOP gefolgt von einer ASCT. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Verbesserung bezüglich PFS im Vergleich zur alleinigen Therapie mit R-CHOP (LaCasce, *et al* 2012). Beim Rezidiv oder therapierefraktären MZL sind für die symptomatischen Patienten neuere Therapieoptionen zu diskutieren. So wurden Patienten mit R-Bendamustin therapiert, die vorher einer anderen Therapie unterzogen waren. Bei 63 Patienten gab es Ansprechraten von 63% und CR in 60%. PFS lag bei 30 Monaten (Rummel, *et al* 2005).

Jedoch werden auch andere beim MZL deregulierte Signaltransduktionswege mit neueren Präparaten beeinflusst. Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib zeigte als Einzelsubstanz (Goy, *et al* 2009), aber auch in Kombination mit Rituximab und Bendamustin erfolgsversprechende Ergebnisse mit einer Ansprechraten von 71% bei der Kombinationstherapie (Friedberg, *et al* 2011). Wie beschrieben, spielt der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg eine Rolle in der Genese des MZL. Erste klinische Phase-II-Studien mit Temsirolimus, welches in diesem Transduktionsweg eingreift, bei therapierefraktären oder rezidivierenden Fällen haben eine Gesamtansprechraten (ORR) von 44% gezeigt. Jedoch zeigten Phase-II-Studien ein geringes PFS von nur 4,8 Monaten (Ansell, *et al* 2008, Hess, *et al* 2009). Des Weiteren greifen der BTK-Inhibitor Ibrutinib oder der PI3K-Inhibitor Idelalisib in den BCR-Signaltransduktionsweg ein. In einer kleineren Studie zeigte Ibrutinib eine ORR von

69% und eine CR von 16% (Wang, *et al* 2013). Eine andere Studie konnte eine ORR von 40% bei Idealisib nachweisen (Kahl, *et al* 2014). Ein anderer Ansatz ist der Einsatz von Yttrium⁹⁰-Ibritumomab Tiuxetan, bei dem ein β -Strahler mit dem monoklonalen Antikörper verbunden wurde. Hierdurch kommt es zu einer lokalen Bestrahlung des Tumors. Die Ansprechraten lagen bei ca. 31% (Wang, *et al* 2009). Ergänzende Daten zur Konsolidierungstherapie nach R-CHOP zeigen hierfür gute Ansprechraten (Smith, *et al* 2012). Andere Gruppen haben das immunmodulatorische Medikament Lenalidomid eingesetzt. Lenalidomid zeigte eine ORR von 28% als Einzelsubstanz (Goy, *et al* 2013) und 57% in Kombination mit Rituximab bei MZL-Rezidiven (Wang, *et al* 2012). Die Daten zur autologen oder allogenen Stammzelltransplantation beim rezidivierenden oder therapierefraktären MZL sind limitiert. Fenske *et al.* konnten zeigen, dass der Einsatz bei Chemotherapie-sensiblen Patienten der Zeitpunkt der Transplantation entscheidend ist. Der beste Effekt konnte bei Patienten nach der ersten CR gesehen werden. Bei therapierefraktären Patienten oder Rezidiven ist entweder eine ASZT oder eine intensitäts-reduzierte allogene SZT möglich. Hierbei sind die langfristigen Ergebnisse und OS signifikant schlechter (Fenske, *et al* 2014). So wie bei anderen Lymphomarten ist jedoch die chronische Graft-versus-Host-Reaktion der limitierende Faktor bei der allogenen Stammzelltransplantation, insbesondere bei den älteren und vorbehandelten MZL-Patienten (Tam, *et al* 2009). Der wichtigste Schritt bei der Verbesserung der Therapie-Ergebnisse beim MZL und anderer B-NHL war die Einführung des monoklonalen Antikörpers (mAk) Rituximab (Alduaij and Illidge 2011). Das Hinzufügen zu den Standardchemotherapien verbesserte das OS bei jüngeren und älteren Patienten signifikant (Griffiths, *et al* 2011, Schulz, *et al* 2007).

2.3 Anti-CD20-Antikörper

2.3.1 Das CD20-Molekül

Das membranständige CD20-Molekül ist ein nicht-glykosyliertes Phosphoprotein, welches als Oberflächenmolekül auf reifen B-Zellen, nicht jedoch auf Plasmazellen exprimiert wird (Stashenko, *et al* 1980). Es ist ein 33-35 kDa großes Protein, welches zunächst auch unter der Bezeichnung B1 bekannt war (Cragg, *et al* 2005). Es besteht aus zytoplasmatischen N- und C-Termini und insgesamt vier hydrophoben Arealen, die zur Verankerung in der Zellmembran zuständig sind (Einfeld, *et al* 1988). Obwohl die eindeutige Funktion des CD20-Moleküls nicht geklärt ist, wird ein Kalzium-Ionen-Kanal-abhängiger Wirkmechanismus nach Aktivierung des BZR-Transduktionsweges diskutiert (Beers, *et al* 2010a, Cragg, *et al* 2005). Es wird zum Teil davon ausgegangen, dass es nach einer Bindung an das Molekül nicht zu einer Internalisierung oder einem Abbau des CD20 kommt (Glennie, *et al* 2007). Neuere Daten weisen daraufhin, dass es entgegengesetzt älterer Annahmen jedoch zu einer Modulation des Moleküls nach der Bindung von Anti-CD20-Antikörpern kommen kann. So kommt es beim MZL häufiger als beim follikulären und diffusen großzelligem B-Zell-Lymphom zu einer Internalisierung des CD20/mAk-Komplexes (Beers, *et al* 2010b). Des Weiteren wurden frei zirkulierende CD20-Moleküle nachgewiesen, welche möglicherweise den Anti-CD20-Antikörper Rituximab von der Bindung an CLL-Zellen abhalten könnten (Giles, *et al* 2003, Manshouri, *et al* 2003).

2.3.2 Überblick und Wirkmechanismen der Antikörper

Seit der Erfindung der monoklonalen Antikörpertechnologie konnten viele Erkenntnisse zum Wirkmechanismus von Anti-CD20-Antikörpern gewonnen werden (Alduaij and Illidge 2011, Kohler and Milstein 1975). Anti-CD20-Antikörper sind in verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt, die zum Tumorzellsterben führen (Lim, *et*

al 2010). Diese gut bekannten Fc-Fcγ Rezeptor (Fc-FcγR) Interaktionen beinhalten die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (engl. antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), die Komplement-abhängige Zytotoxizität (engl. complement-dependent cytotoxicity, CDC), die direkte Induktion des programmierten Zelltods (engl. direct induction of programmed cell death, PCD) als auch die Phagozytose (engl. antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) (Alduaij, *et al* 2011, Lim, *et al* 2010). Anti-CD20-Antikörper werden nach ihrem Bindungsverhalten am CD20-Molekül sowie ihrer primären Wirkmechanismen unterteilt (van Meerten and Hagenbeek 2010). Somit können sie nach ihren Funktionsprofilen in zwei Typen klassifiziert werden: Typ I und II (Chan, *et al* 2003, Glennie, *et al* 2007). Zu den Typ I Antikörpern gehören Rituximab, Veltuzumab, Ocrelizumab und Ofatumumab, zu den Typ II Antikörpern werden Obinutuzumab und Tositumomab gezählt (van Meerten and Hagenbeek 2010). Typ I Antikörper, wie zum Beispiel Rituximab, sind in der Lage CD20-Moleküle in Lipid Rafts, sogenannten cholesterinreichen Domänen von Zellmembranen (Thomas, *et al* 2004) umzuverteilen und damit die potente CDC mittels C1q-Bindung zu aktivieren (Cragg, *et al* 2003). Jedoch bleibt der letztendliche Beitrag der CDC zur *in vivo* B-Zell-Depletion ungeklärt (Beers, *et al* 2008). Im Gegensatz zu Typ I mAks sind Typ II mAks wie z.B. Obinutuzumab oder Tositumomab effektive Mediatoren des direkten Zelltods, welcher ebenfalls als nicht-klassische Form der Apoptose bekannt ist (Chan, *et al* 2003, Glennie, *et al* 2007). Typ II Antikörper translozieren CD20 nicht in Lipid Rafts und führen somit zu einer weniger potenten Induktion von CDC (Chan, *et al* 2003, Ivanov, *et al* 2008). Des Weiteren sind Typ II Antikörper in der Lage vermehrte homotypische Zellaggregation auszulösen. (Mossner, *et al* 2010). Es wurde vorgeschlagen, dass homotypische Zellaggregation und die PCD-Induktion über die Aktin-Relokalisation nach der Antikörperbindung

verbunden sind. So soll es zu einer Schwellung und Desintegration der Lysosomen kommen, einem Prozess der als Lysosomen-Membran-Permeabilisation bekannt ist (Ivanov, *et al* 2009, Jak, *et al* 2011, Kroemer and Jaattela 2005, Niederfellner, *et al* 2011). Neuere Erkenntnisse weisen daraufhin, dass diese Form des direkten Zelltods nicht die klassischen Merkmale der Apoptose, wie die zum Beispiel die Kaspasenabhängigkeit oder die DNS-Schädigung, aufzeigt, sondern über die Formierung von sogenannten „reactive oxygen species, ROS“ abläuft (Honeychurch, *et al* 2012). Ein weiterer signifikanter Unterschied ist die Stöchiometrie des Bindungsverhaltens. B-Zellen können im Verhältnis 2:1 Typ I mAk im Vergleich zu Typ II mAk binden (Mossner, *et al* 2010). Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass Typ I mAk zwischen zwei CD20-Tetrameren binden, wohingegen Typ II mAk innerhalb eines Tetramers binden (Cragg 2011, Niederfellner, *et al* 2011). Abbildung 2 veranschaulicht dieses Prinzip, wodurch es zu einer Akkumulation der Typ I mAk in den Lipid Rafts kommt (Klein, *et al* 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Typ II mAk eine höhere *in vivo* Wirksamkeit haben und vielversprechende Effekte in frühen klinischen Studien zeigen (Beers, *et al* 2008, Cragg and Glennie 2004, Ogura, *et al* 2013).

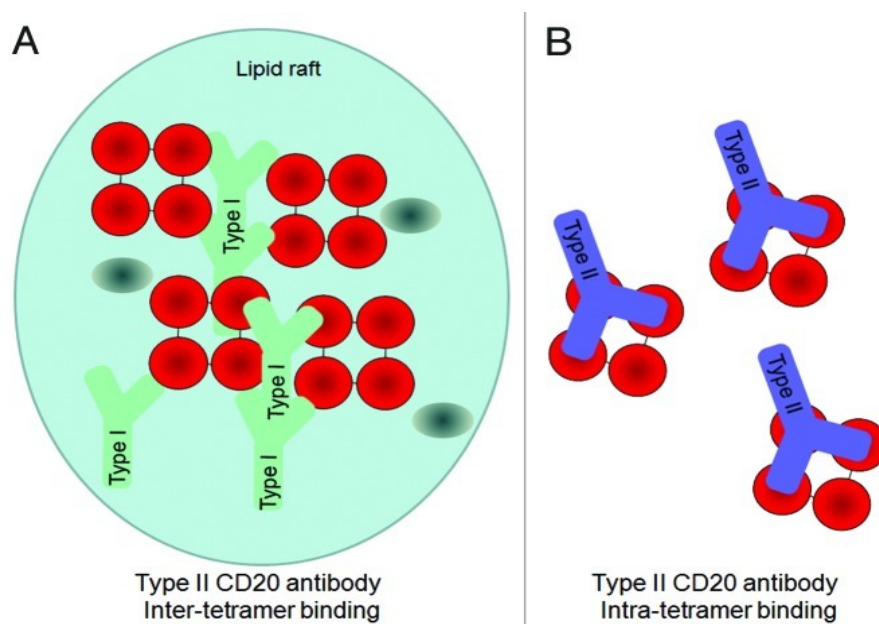


Abbildung 2: Hypothetisches Modell der 2:1 Bindungsverteilung der Typ I und II mAk. (CD20-Tetramere: rot). Teil A zeigt die inter-tetramere Bindung der Typ I mAk. Teil B zeigt die intra-tetramere Bindung der Typ II mAk. Entnommen aus (Klein, *et al* 2013)

2.3.3 Rituximab

Rituximab ist ein chimärer Typ I IgG1 Anti-CD20 Antikörper, bestehend aus konstanten humanen und variablen murinen Anteilen, welcher zum aktuellen Zeitpunkt der wichtigste Anti-CD20 Antikörper in der Therapie diverser Lymphome darstellt (Boye, *et al* 2003, Reff, *et al* 1994). Rituximab wurde 1997 als erster Anti-CD20 Antikörper zur Therapie zugelassen. Erste Ergebnisse bei therapierefraktären Lymphomen führten rasch zur Etablierung der neuen Substanz (Maloney 2012, Maloney, *et al* 1997). Rituximab hat eine in vivo Eliminationshalbwertszeit von 22 Tagen (Roche).

2.3.4 Obinutuzumab (GA101)

Obinutuzumab ist ein neuer voll-humanisierter Typ II IgG1 Anti-CD20 Antikörper, welcher vom murinen Antikörper B-Ly 1 entstammt. Die vermehrte ADCC wird mittels der durch Glykoengineering am Fc-Teil angefügten afukosylierten Oligosaccharide vermittelt (Mossner, *et al* 2010, Niwa, *et al* 2004). Obinutuzumab ist durch die Induktion von homotypischer Adhäsion und nicht-apoptotischen programmierten Zelltod charakterisiert. Der Typ II mAk weist weiter eine geringere CDC-Aktivität auf und führt nicht zur Relokalisation der CD20-Moleküle in Lipid Rafts (Mossner, *et al* 2010). PCD wird lysosomal und abhängig von der Aktin-Relokalisation und nicht von BCL-2-Expression oder Kaspasen-Aktivierung vermittelt (Alduaij, *et al* 2011). Epitopencharakterisierungen und Strukturanalysen haben gezeigt, dass Obinutuzumab anders als Typ I mAk an CD20-Moleküle bindet. Der Antikörper weist zwei entscheidende Eigenschaften auf: es verfügt über einen nicht-fukosylierten Fc-Teil und eine modifizierte „elbow-hinge“-Region („Ellenbogengelenks-Region“) (Mossner, *et al* 2010, Niederfellner, *et al* 2011). Durch diesen modifizierten Fc-Teil kommt es über erhöhte Bindungsaffinitäten zu FcγRIIIa-158F und FcγRIIIa-158V Varianten zur verstärkten Induktion von ADCC via der Rekrutierung und Bindung von Effektorzellen

(Mossner, *et al* 2010). Durch den Austausch der Aminosäure Valin beim murinen B-Ly 1 Antikörpers an Kabatposition 11 durch Leucin, kommt es zu einer Erweiterung des „elbow-hinge“-Öffnungswinkels um 30° für Obinutuzumab im Vergleich zu Rituximab (Niederfellner, *et al* 2011), welches ebenfalls zu einer Verbesserung der ADCC führen kann (Mossner, *et al* 2010). Die 2:1 Stöchiometrie des Bindungsverhalten der Typ I Antikörper im Vergleich zu Obinutuzumab weist auf potentielle Unterscheidungsmöglichkeiten der beiden Antikörper auf molekularer Ebene hin (Mossner, *et al* 2010, Niederfellner, *et al* 2011). Die folgende Abbildung 3 zeigt die Bindungsstellen der verschiedenen Antikörper am CD20-Molekül. Es ist zu erkennen, dass sich die Bindungsstellen für Rituximab und Obinutuzumab überlappen. Die Grafik zeigt des Weiteren die Bindungsstelle von Ofatumumab, welche keine Überlappung aufweist und eines weiteren Typ I Antikörpers 2H7 (Ocrelizumab). Protein-tomographien konnten zeigen, dass Obinutuzumab meist kovalent an das CD20-Molekül bindet, wohingegen Rituximab auch an große CD20-Komplexe bindet, welche aus Netzwerk-ähnlichen Strukturen noch nicht identifizierter Proteine bestehen (Niederfellner, *et al* 2011). Diese unterschiedlichen Bindungsgeometrien seien unter anderem für die unterschiedlichen präklinischen und klinischen Ergebnisse der mAk verantwortlich (Klein, *et al* 2013).

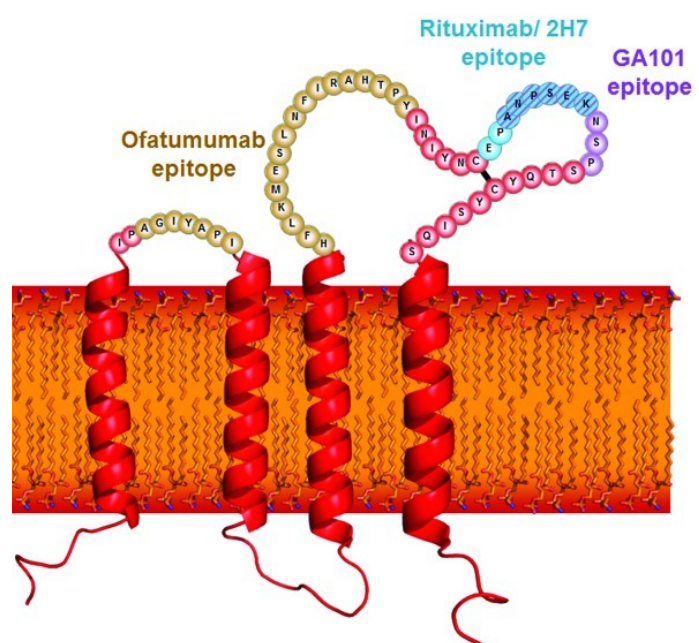


Abbildung 3: Bindungsstellen von Rituximab (Türkis), Obinutuzumab (GA101, Lila), Ofatumumab (Gold) und Ocrelizumab (2H7, ebenfalls Türkis) am CD20-Molekül. Die straffierten Abschnitte zeigen die überlappenden Bereiche der Bindungsstellen für Rituximab und Obinutuzumab an. Entnommen aus (Klein, *et al* 2013).

Der klinische Einsatz von Obinutuzumab ist aktuell noch sehr limitiert. Eine Phase I Studie an 22 Patienten mit CD20-positiven NHL-Rezidiven oder CLL zeigte ein partielles Ansprechen von 22%, sowie vergleichbare Nebenwirkungsraten wie bei Rituximab (Sehn, *et al* 2012). Die GAUGUIN – Studie, eine Phase I und II - Studie bei Patienten mit therapierefraktärer CLL oder Rezidiven zeigte Obinutuzumab erfolgsversprechende Ergebnisse. Die Gesamtansprechraten lag jedoch in der Phase II unterhalb der Phase I, mutmaßlich aufgrund der weiter fortgeschrittenen Tumorstadien der Phase II-Patienten (Cartron, *et al* 2014). In einem weiteren Teil der GAUGUIN – Studie erfolgte die Untersuchung von Patienten mit diffusem großzelligen B-Zell NHL und MZL, ebenfalls im Stadium des Therapieversagens oder nach Rezidiv. Die Phase II-Resultate weisen ausreichende Therapieergebnisse und Sicherheitsprofile aus. So zeigten sich Ansprechraten von 27% bei MZL-Patienten (Morschhauser, *et al* 2013). Im Rahmen der Phase II-GAUDI-Studie erfolgte die Untersuchung der Sicherheitsprofile der Obinutuzumab Kombinationstherapien entweder mit Fludarabin und Cyclophosphamid oder CHOP beim folliculären Lymphom. G-CHOP (Obinutuzumab plus CHOP) führte zu kompletten Remissionen von 39%, G-FC (Obinutuzumab plus Fludarabin und Cyclophosphamid) erzielte sogar 50% (Radford, *et al* 2013). Die Ergebnisse der CLL11 Phase III Studie führten zur Zulassung von Obinutuzumab durch die FDA (U.S. Food and Drug Administration) bei der Behandlung von zuvor unbehandelten CLL-Patienten in Kombination mit Chlorambucil (Lee, *et al* 2014).

3 Fragestellung der Arbeit

Die Rituximab-Therapie ist ein weitverbreiteter Standard der Mantelzelllymphom-Therapie. Jedoch sind die genauen Wirkmechanismen des Typ I mAk Rituximab und des neueren Typ II mAk nicht ausreichend geklärt. Die oben aufgeführten Effektor-Funktionsprofile und Epitopencharakterisierungsanalysen zugrunde legend, ist es das Ziel dieser Arbeit die differentiellen Regulierungsmuster der monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab und Obinutuzumab auf einer transkriptionellen Ebene vergleichend zu untersuchen. Um gemeinsame und unterschiedliche Signaltransduktionswege zu finden, führte ich eine *in vitro* Studie zur Untersuchung der direkten transkriptionellen Veränderungen in isolierten MZL-Zelllinien ohne Effektorzellen nach Rituximab oder Obinutuzumab Mono- und Kombinationstherapien durch.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

Die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Zelllinien, bis auf Z-138, wurden kommerziell bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland, erworben. Z-138 wurde von LGC Standards GmbH gekauft. Die anschließenden Informationen zur Charakterisierung der einzelnen Zelllinien wurden dem Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book (Drexler 2000) und der digitalen Neuauflage aus dem Jahr 2005 entnommen (Weinkauff 2008).

Zelllinien	Referenz	Charakterisierung	Karyotyp
Granta-519	(Rudolph, <i>et al</i> 2004)	B-NHL (MCL) Donor: 58 jährige Frau, peripheres Blut etabliert: 1991	hypodiploid, 8% polyploid; 44(39-44)<2n>XX, -12, -17, -18, +mar, add(1)(p22), del(3)(p14p23), i(8p), i(8q), add(9) (p22)x1-2, t(11;14)(q13;q32), add(13)(p12), add(18)(q21); side-line with two copies of der(14) and der(9)
Jeko-1	(Jeon, <i>et al</i> 1998)	B-NHL (MCL) Donor: 78 jährige Frau, peripheres Blut etabliert: 1998	hypertriploid; 70-78<3n>XXXX, +X, +1, +2, +2, +4, +6, +7, -8, +10, +11, -12, -12, +13, +14, +15, -17, +18, -19, -19, -22, +2-4mar, del(X) (p21)/add(X)(p11.2)x2, der(X) t(X;11)(q26-28;q13)t(11;?10)(q24;?p12), der(1) t(1;2)(p21;q22)x2, add(2)(q2?), del(2)(q11), add(3)(q27), der(5)t(5;12)(p15;p11-12) x2, add(6)(p21)x2, der(6;13)(p10;q10)x1-2, der(7)t(4;7)(q2?6;q32.1)x2, add(9)(p2?), der(9)t(9;14)(q34-35;q32-33)x2, der(10) t(10;11) (p12;?)x2, der(11) t(11;14) (q13;q32)x1-2, add(13)(p11), der(13)t(13;?) (p11;?)t(13;?)t(13;q11),add(14) (p11), der(14) t(14;17) (p12;q11) t(14;6) (q24;?p11), der(14) t(11;14) (?;p11) t(11;?8) (?;?), del(16) (p11), add(17)(p11), ins(19;12) (q13.1;q13.2q2?4)x2
Karpas 422	(Dyer, <i>et al</i> 1990)	B-NHL (DLBCL) Donor: 73 jährige Frau, Pleuraerguss etabliert: 1987	hyperdiploid, 10% polyploid; 47(44-48)<2n>XX, +14, t(2;10)(p23;q22), t(4;11) (q21;q24), t(4;16)(q21;p13), der(14)t(14;18) (q32;q21)x2

Rec-1	(Rimokh, <i>et al</i> 1994)	B-NHL (MCL) Donor: 61 jähriger Mann, Lymphknoten oder peripheres Blut etabliert: 1987	human highly rearranged flat-moded near-diploid karyotype with 25% polyploid - 41-47<2n>XY/XXY, -2, -8, +11, +12, -13, -22, add(5)(p15), i(7q), add(9)(p22), der(9)t(9;17)(q3?1;q11-12), add(10)(q24-q25), add(11)(q11), t(11;14)(q13;q32), add(12)(q22), der(12)t(8;12)(q11;p12), der(12)t(12;16)(p11;p11), der(16)t(16;17)(p11;q25)t(2;16)(p1?2;q2?1), der(16)t(16;22)(p13;q11), add(17)(q25)x2 - carries t(11;14) effecting rearrangement of IGH with CCND1/BCL1 - near tetraploid sideline with additional rearrangements present
Z-138	(Estrov, <i>et al</i> 1998)	B-NHL (MCL) Donor: 70 jährige Frau, peripheres Blut etabliert: 1987	48, XY, +12, +13, der(8)t(8;14;?)(q24;q32;?), der(9)t(9;?)(q34;?), del(11)(q13q25), del(12)(q22q24.1), der(14)t(14;18;?)(q32;q21;?), der(18)t(14;18;?)(q32;q21;?)

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Die für die *in vitro* Experimente verwendeten Zelllinien sind die etablierten MZL-Zelllinien Granta 519, Jeko-1, Rec-1 und Z-138. Als Kontrollzelllinie wurde Karpas 422, ein humanes diffuses großzelliges Lymphom, verwendet. Alle Zelllinien wurden bei einer konstanten Temperatur von 37°C (5% CO₂ in RPMI 1640, 2mM L-Glutamin und 20% FKS) inkubiert.

4.1.2 Monoklonale Antikörper

Obinutuzumab	„GA101“, Roche, Glycart, Penzberg, Deutschland
Humane Anti-IgG-Ak	Isotypen-Kontrolle, ganze Moleküle, Roche, Penzberg, Deutschland
Rituximab	Roche, Penzberg, Deutschland

4.1.3 Puffer, Antibiotika und Lösungen

DMSO	Dimethylsulfoxid, PAN™ Biotech GmbH
Fötales Kälber Serum	0,1µm steril filtriert, Herkunft: Süd-Amerika; PAN™ Biotech GmbH

Penicillin/Streptomycin	10.000 U Pen/ml; 10mg Streptomycin/ml; PAN™ Biotech GmbH
RPMI-1640	L-Glutamine mit 2,0 g/l NaHCO ₃ , steril gefiltert, Vol. 500ml; PAN™ Biotech GmbH
Vi-Cell™ Cleaning Agent	biologisch abbaubar, säurefreies Reagenz, enthält ein proteolytisches Enzym, BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA
Vi-Cell™ Buffer Solution	Part # 383202, BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA
Vi-Cell™ Trypan Blue	Part # 383200; 0,4% in NaCl, BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA
Vi-Cell™ Disinfectant	Part # 383201, BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA
QIAshredders	Qiagen Cat. No. 79654, QIAGEN GmbH – Hilden, Deutschland

4.1.4 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	1-200µl; 101-1000µl: Natural Graduated Pipette Tips, RNase, DNase, DNA und Pyrogen frei; (Starlab GmbH)
Stripetten	25 ml; 10 ml; 5 ml; 2 ml; 1 ml; (Costar)
Zellkulturflaschen	PE Vented Cap Green; 25, 75, 150 cm ³ ; (Sarstedt, Inc.)

4.1.5 Verwendete Geräte

Vi-Cell™ AS Cell Viability Analyzer, Seriennummer: AF47079, BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA

Inkubatoren, Tiefkühlschränke, Kühlschränke sowie weitere Geräte in der KKG Leukämie, Helmholtz Zentrum München

4.1.6 Verwendete Software

Vi-Cell 1.01™	BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA
MS-Office 2011™	Microsoft, Redmond, WA, USA
IPA Ingenuity Pathway Analysis™	Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com , Redwood City, CA, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle oben beschriebenen Zelllinien sind Suspensionszelllinien, die entweder in Clustern oder vereinzelt wachsen. Es galten die folgenden Standardbedingungen zur Kultivierung der Zelllinien im Inkubator: 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% relative Luftfeuchtigkeit. Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen in 90 % RPMI-1640 Medium gehalten, welches mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und einer Antibiotika-Kombination von 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin ergänzt wurde. Das FKS wurde vor dem Gebrauch in der Zellkultur nach dem Auftauen bei 56°C für 50 Minuten im Wasserbad erhitzt, um die noch vorhandenen hitzeempfindlichen Bestandteile des Komplementsystems im Serum zu inaktivieren. Die in Kultur gehaltenen Zellsuspensionen wurden mindestens dreimal pro Woche zelldichteabhängig geteilt. Dabei wurde die Suspension meist zu zwei Dritteln durch frisches Medium ersetzt. Alle Zellreihen wurden regelmäßig (mindestens alle 3 Monate) durch PCR (Polymerase-Kettenreaktion) Nachweis gescreent, um Verwechslungen oder Kreuzkontaminationen zu detektieren. Des Weiteren wurden die Zellen auf eine Mykoplasmen-Kontamination hin untersucht. Bei gegebenenfalls positivem Testergebnis wurden die Zelllinien durch frisches Material ausgetauscht (Weinkauf 2008).

4.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellreihen

Nach einer Dichtebestimmung der viablen Zellen der einzufrierenden Zellreihen mittels Trypanblau-Ausschlusstest wurden 1×10^7 Zellen pro Tiefkühlbehälter durch Zentrifugation (250 rcf, 10min, 24°C) geerntet. Die so gewonnenen Zellpellets wurden daraufhin in 1 ml gekühltem 90% FKS und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) pro 1×10^7 Zellen resuspendiert und sofort in einem Tiefkühlschrank bei einer Temperatur von – 80°C gelagert. Bei der Rekultivierung tiefgefrorener Zellreihen wurden die Zel-

len schnellstmöglich aufgetaut und in einem nächsten Arbeitsschritt in 15 ml vorgekühltes Medium aufgenommen und anschließend für 10 Minuten bei 250 rcf und 4°C abzentrifugiert. Somit konnte das zum Einfrieren benötigte zelltoxische DMSO entfernt werden. Der Überstand wurde entsorgt und die frisch aufgetauten Zellen in 20 ml 1640-RPMI-Medium aufgenommen, wobei alle Zelllinien in den ersten 24 Stunden in einer erhöhten FKS Konzentration (20%) gehalten wurden (Weiglein 2012).

4.2.3 Viabilitätsbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlusstest

Die Bestimmung der Viabilität und Zellzahl der behandelten und kultivierten Zellreihen erfolgte mittels des Trypanblau-Ausschlusstests. Bei dieser Methode werden nicht-viable Zellen durch das Naphthalinsulfonat Trypanblau ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$) angefärbt. Lebende Zellen werden dagegen nicht angefärbt, da sie aufgrund einer noch intakten Zellmembran fähig sind den toxischen Farbstoff mittels aktiver Pumpen aus dem Zellinneren in den extrazellulären Raum zurückzubefördern. Die somit nicht angefärbten Zellen erscheinen bei der Bestimmung der Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer im Durchlichtmikroskop hell bzw. transparent. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgt durch die Anzahl der Zellen in vier sogenannten Großquadranten. Es gilt die folgende Formel bei einer 1:1-Mischung von Zellsuspension zu Trypanblau:

$$(N_2) = (N_1/2) \times 10^4$$

N_1 gibt die Anzahl der Zellen in den vier Quadranten der Zählkammer und N_2 die Anzahl der Zellen pro Milliliter Zellsuspension an (Weiglein 2012).

4.2.4 Viabilitätsbestimmung mittels Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer

Der Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer von BeckmanCoulter (Fullerton, CA, USA) ist ein computergestütztes halbautomatisiertes Zellzählgerät. Das Gerät verwendet in

einem standardisierten Ablauf den im oberen Abschnitt beschriebenen Trypanblau-Ausschlusstest, um die Zellviabilität der Proben zu analysieren. Dazu vermischt das Vi-CELL™ Gerät die Zellsuspension mit einer definierten Menge an Trypanblau.

Der folgende festgelegte Ablauf stellt die Reliabilität, also die Zuverlässigkeit, ob ein Messergebnis bei einem erneuten Versuch stabil bleibt, sicher. Vor Beginn der Experimentreihe wurde das Gerät auf die zu untersuchenden Zellen der jeweiligen Zelllinie geeicht. Es lassen sich diverse Parameter einstellen: (Zelldurchmesser, Verdünnungsfaktor, Zirkularität). Die Zellsuspension, mit einem Volumen von 1 ml, wird von dem Gerät automatisch aspiriert und gleichmäßig mit Trypanblau vermengt. Dieses Gemisch wird darauffolgend in einen Durchfluss-Zytometer weitergeleitet. Das Gerät erstellt nun mittels einer eingebauten Kamera (640 x 480 CCD Array) Einzelaufnahmen für die 100 zu zählenden Quadranten. Diese Aufnahmen werden digital gespeichert und sind somit zur Nachkontrolle der gemessenen Daten geeignet. Auf die Messung folgt ein automatisiertes Reinigungsprogramm bei dem das Gerät mittels eines Waschmittels, welches ein proteolytisches Enzym enthält, alle Reste aus dem geschlossenen Systemkreislauf entfernt. In einem nächsten Schritt wird das System mit einer Puffer-Lösung gespült und von einem Desinfektionsmittel abschließend gereinigt. Das Vi-CELL™ ist daraufhin bereit die nächste Zellsuspension aus dem Probenkarussell zu aspirieren. Ein patentierter Algorithmus hilft der Software auf dem angeschlossenen Computer zu unterscheiden, welche Zellen mit Trypanblau gefärbt und welche farblos sind. Der erste Schritt ist die Umwandlung der digitalen, kontinuierlichen Bilder in eine Pixelmatrix. Für die auf den Aufnahmen dargestellten Elemente wird eine Graustufe bzw. ein Helligkeitswert auf einer Skala zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß) errechnet. Software-definierte Schwellen- bzw. Grenzwerte bestimmen welche Zellen Trypanblau aufgenommen haben. Als nicht-

viabel werden Zellen beurteilt, die sich dunkel darstellen und niedrigere Graustufenwerte haben. Im Gegensatz dazu werden Zellen mit höheren Werten als viabel beurteilt. Die Software ermittelt somit Daten zur absolut gemessenen Zellzahl, die Anzahl als viabel eingeschätzten Zellen und berechnet die Viabilität in Prozent. Des Weiteren können mehrere Parameter zu den einzelnen Zellen angezeigt werden. Hierzu gehört zum Beispiel auch die durchschnittliche Größe der Zellen. Die Daten werden gespeichert und daraufhin in ein Microsoft Excel™ Datenblatt exportiert und stehen der weiteren Auswertung zur Verfügung (Weinkauf 2008).

4.2.5 Mono- und Kombinationstherapien

Für die Trypanblau-Ausschlusstests mittels ViCell-Analyse wurden die MZL-Zelllinien (Granta 519, Jeko-1, Rec-1 und Z-138) und als Kontrollzelllinie Karpas 422 verwendet. Die Experimente wurden durchgeführt, um den Effekt der Anti-CD20-Antikörper Obinutuzumab und Rituximab als Monotherapeutika als auch in Kombination auf Zellviabilität und Proliferation zu bestimmen. Alle Experimente wurden als biologische Triplikate angelegt. Zunächst erfolgten Dosisfindungsexperimente mit den oben genannten Zelllinien. Die Zellen wurden mit folgenden Obinutuzumab-Konzentrationen behandelt: 1,25, 2,5, 5, 10 und 20 µg/ml. Die Dosisfindungsexperimente für Rituximab wurden durch die Mitdotorandin Kristina Decheva durchgeführt. Hier erfolgte der gleiche Versuchsaufbau mit den gleichen Konzentrationen. Nach Durchführung der Dosisfindungsexperimente erfolgten die folgenden Experimente mit einer Obinutuzumab und Rituximab-Konzentration von jeweils 10 µg/ml. Die MZL-Zellen wurden somit mit 10 µg/ml Rituximab oder Obinutuzumab behandelt. Des Weiteren wurden die Zellen ebenfalls in separaten Experimenten simultan mit beiden Anti-CD20-Antikörpern mit identischer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert, um den Effekt der Kombinationstherapie zu bestimmen. Die Zellviabilität wurde mit-

tels Trypanblau-Ausschlusstests zu den Zeitpunkten 0h, 24h, 48h und 72h analysiert. Ergänzend zu den simultanen Kombinationsexperimenten erfolgte ein sequentieller Versuchsaufbau für die Zelllinien Granta-519 und Rec-1. Die Zellen wurden zuerst mit Obinutuzumab (10 µg/ml) und nach 4 Stunden mit Rituximab (10 µg/ml) beimpft. Der Versuchsaufbau wurde ebenfalls mit der umgekehrten Reihenfolge angelegt. Die Zellzählung erfolgte mittels des Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer. Die Auswertung der biologischen Triplikate erfolgte mittels Microsoft Excel zur Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen.

4.2.6 Fraction of Product – Berechnung

Die Kombination unterschiedlicher Medikamente kann zu additiven, synergistischen oder antagonistischen Effekten führen. Für die Viabilitätsbestimmungen mittels der Trypanblau-Ausschlusstests wurden 7 ml (0.5×10^6 /ml) der unterschiedlichen Zelllinien verwendet. Die Zellsuspensionen wurden mit jeweils 10 µg/ml Obinutuzumab und/ oder Rituximab beimpft. Die durch den Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer durchgeführten Messungen erfolgten zu den oben genannten Zeitpunkten. Die Verminderung der gemessenen Zellzahl wird in Relation zu dem entsprechenden Wert der unbehandelten Kontrollprobe gesetzt. Dieser relative Wert wird in Prozent als „fraction affected“ (FA) angegeben. Webb et al. beschrieben 1963 die folgende Formel zur Berechnung des „Fraction of Product“:

$$[(1-FA \text{ Substanz A}) \times (1-FA \text{ Substanz B})] - (1-FA \text{ Kombination Substanz A+B})$$

Ergebnisse größer als 0.1 weisen auf einen synergistischen Effekt hin. Ergebnisse kleiner als - 0.1 werden als antagonistisch bewertet und positive Werte zwischen diesen Grenzen zeigen einen additiven Effekt der untersuchten Substanzen (Webb 1963).

4.2.7 Expressionsanalyse durch Affymetrix®-Microarray

Microarrays ermöglichen es große Mengen an Genexpressionsveränderungen gleichzeitig zu analysieren. Bei den Affymetrix®-Microarrays (Santa Clara, USA) werden synthetisch hergestellte Oligonukleotide verwendet, welche auf den Trägerchip aufgebracht worden sind. Der Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip® (Santa Clara, USA) analysiert über 47.000 Transkripte und Varianten, inklusive 38.500 bekannter Gene. Zur Herstellung der Sonden, die am Ende hybridisiert werden, findet zunächst die Umschreibung von mRNA in doppelsträngige cDNA statt. Hierfür erfolgt die reverse Transkription der mRNA mittels eines T7-Oligo(dT)-Promoter-Primers bei der Herstellung des ersten cDNA-Strangs. Nach der RNase-vermittelten Synthese des zweiten cDNA-Stranges, wird die cDNA purifiziert. Sie dient in der anschließend durchgeführten *in vitro* Transkriptionsreaktion (IVT) als Vorlage. Während der IVT erfolgt ein simultanes Labeling der cRNA mit Biotin als Fluoreszenzfarbstoff. Anschließend werden die markierten cRNA-Sonden gewaschen, fragmentiert und mit den Microarrays hybridisiert. Durch diverse Waschschrte werden die nichtgebundenen Proben von den Microarrays entfernt. Daraufhin erfolgt die Abtastung jeder Position mittels eines Lasers. Die daraus bestimmten Intensitätswerte sind die Grundlage der Auswertung (Weinkauff 2008). Die Vorbereitung und Behandlung der Zellen für die Affymetrix® (Santa Clara, USA) Analyse wurde entsprechend des Herstellerprotokolls wie von Kohlmann (Kohlmann, *et al* 2003) und Rosenwald (Rosenwald 2003) beschrieben, durchgeführt. Die Zellen der Zelllinien Granta-519, Rec-1, Jeko-1 und Z-138 wurden für 4 Stunden entweder mit 10 µg/ml Obinutuzumab (GA101, Roche, Penzberg, Deutschland), Rituximab (Roche, Penzberg, Deutschland), humanen Anti-IgG-Antikörpern (Isotypen-Kontrolle, ganze Moleküle) und PBS (Puffer-Kontrolle, pH 7,2, 7 µl) behandelt. Nach vier Stunden Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert,

gewaschen und resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden daraufhin in „QIA-shredders“ (Qiagen Cat. No. 79654) übertragen, abzentrifugiert und bei -80°C für die Affymetrix® (Santa Clara, USA) Analyse aufbewahrt. Es wurde eine reverse Transkription der mRNA durchgeführt, gefolgt von einer *in vitro* Transkription mit gekennzeichneten cDNA-Nukleotiden. Nach der cRNA Hybridisierung an den Chip wurde die GENECHIP Operating Software (GCOS, Affymetrix®, Santa Clara, USA) für die Analyse verwendet. Der Genechip HU U133 Plus 2.0 wurde für die cRNA Microarray Analyse benutzt. Die Annotierung erfolgte mittels der NetAffx (Affymetrix®, Santa Clara, USA) Datenbank. Alle drei miteinander verglichenen Proben (biologische Triplikate der oben genannten Zelllinien) erfüllten die folgenden Filterkriterien: fold change >1, mean >100, call >0.5 und T-Test p-Wert < 0.05. Die Microarray-Daten wurden analysiert und die Netzwerke wurden mittels der Verwendung von IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Ingenuity® Systems, Redwood City, USA, www.ingenuity.com) erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Viabilitätsbestimmung mittels Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer

5.1.1 Dosisfindungsexperimente: Obinutuzumab (GA101)

Initial erfolgten Dosisfindungsexperimente mit den Zelllinien Granta-519, Jeko-1, Rec-1 und Z-138. Die Zellen wurden wie oben beschrieben in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ /ml bei 37°C inkubiert und mit 1,25, 2,5, 5, 10 und 20 µg/ml beimpft. Die Viabilitätsbestimmung mittels Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer erfolgte an den folgenden definierten Zeitpunkten: 0h, 24h, 48h und 72h. Die Ergebnisse der Dosisfindungsergebnisse sind in den folgenden Abbildungen (4a-d) dargestellt. Die Ergebnisse zeigen in unterschiedlichen Konzentrationen vergleichbare Viabilitätsreduktionen. Zur besseren Vergleichbarkeit mit bereits veröffentlichten Experimenten wurde dann in den folgenden Experimenten die Konzentration von 10 µg/ml gewählt (Franke, *et al* 2011).

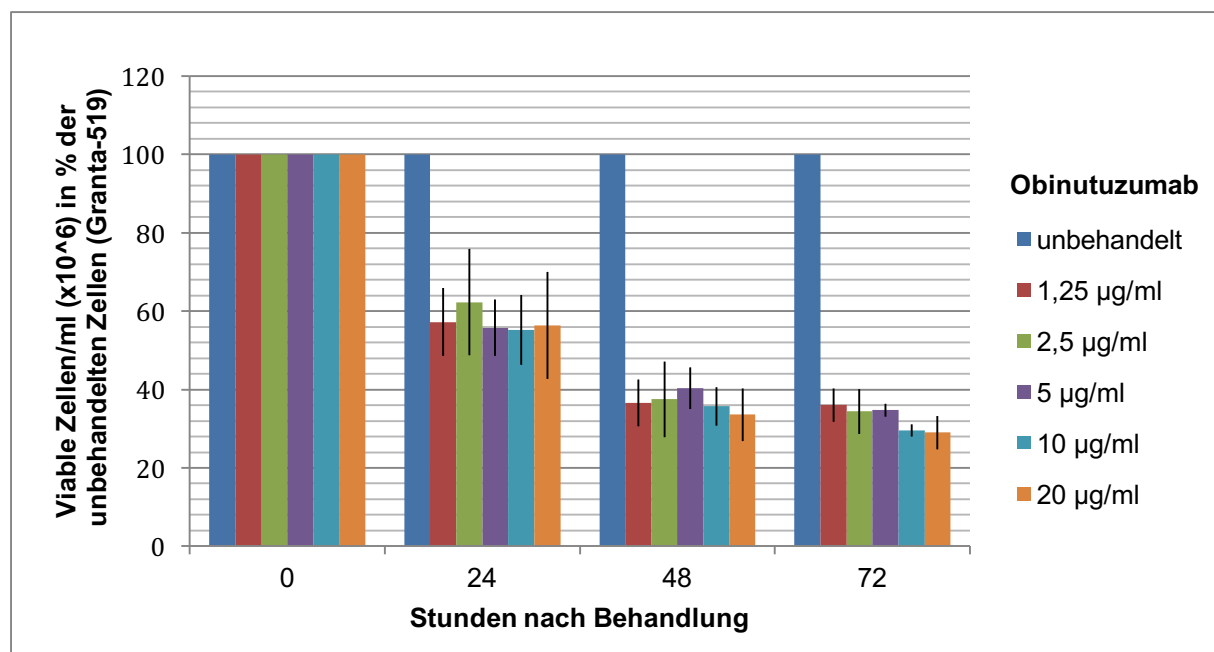


Abbildung 4a: MZL-Zelllinie **Granta-519**: Lebende Zellen pro Milliliter ($\times 10^6$) in Prozent der unbehandelten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Therapie mit Obinutuzumab in diversen Konzentrationen. Die schwarzen Linien zeigen die Standardabweichung der Triplikate an.

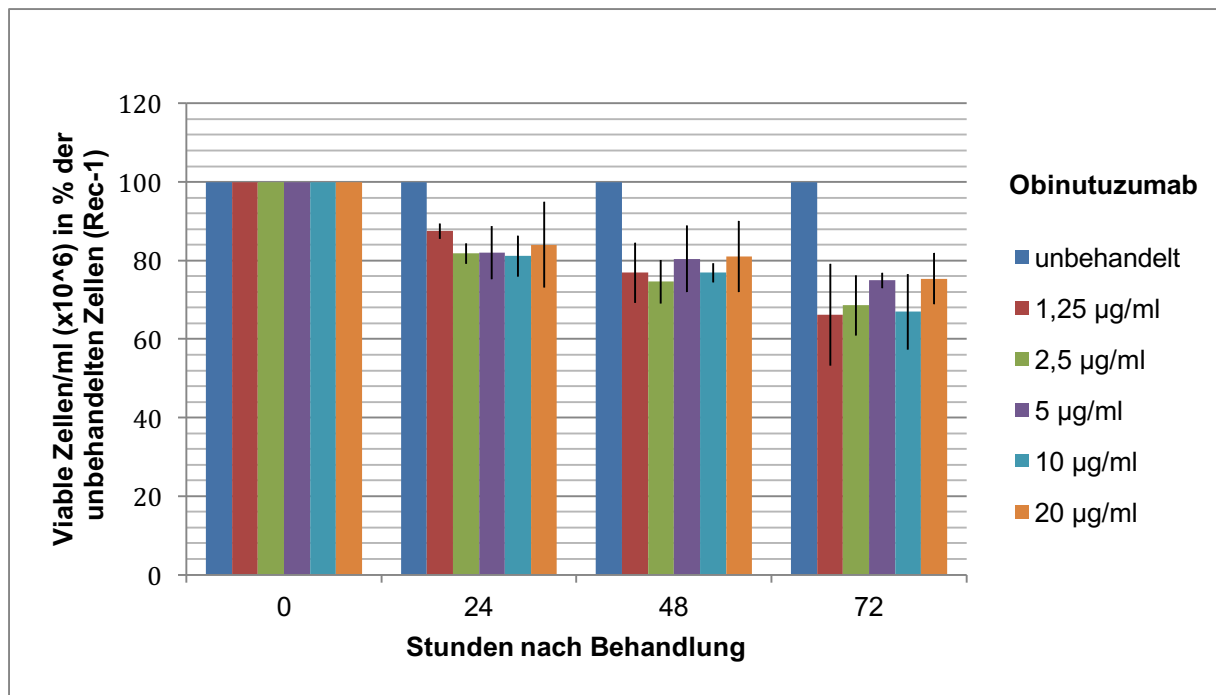


Abbildung 4b: MZL-Zelllinie **Rec-1**: Lebende Zellen pro Milliliter ($\times 10^6$) in Prozent der unbehandelten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Therapie mit Obinutuzumab in diversen Konzentrationen. Die schwarzen Linien zeigen die Standardabweichung der Triplikate an.

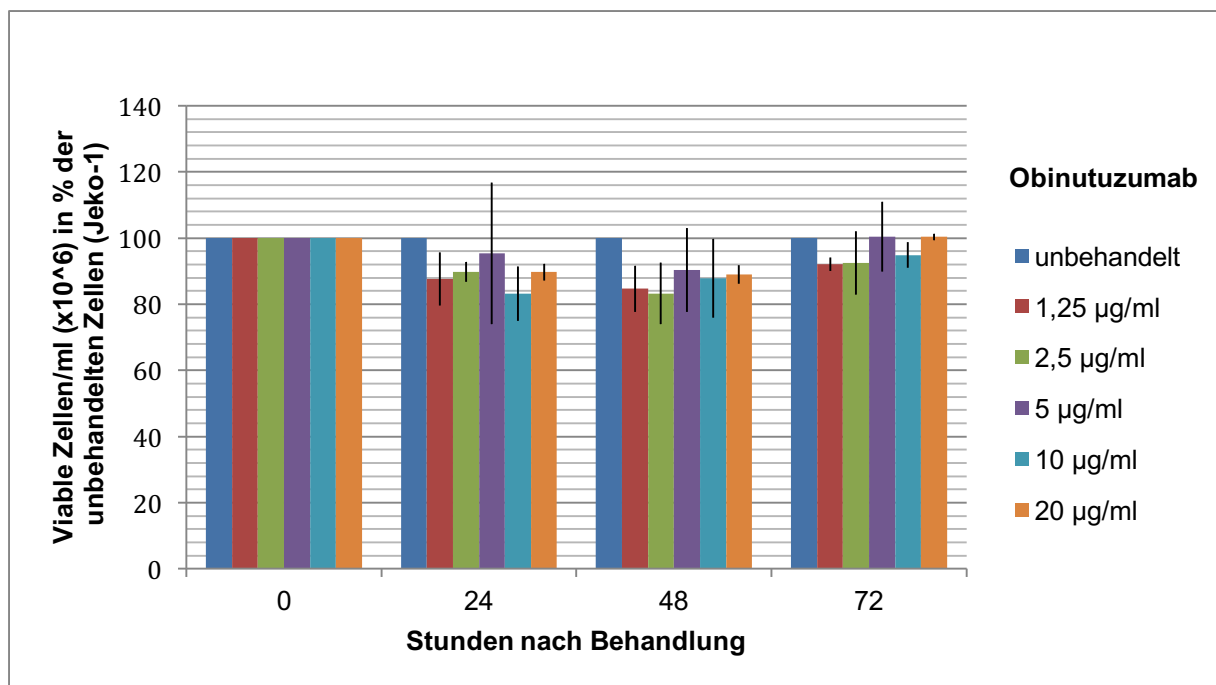


Abbildung 4c: MZL-Zelllinie **Jeko-1**: Lebende Zellen pro Milliliter ($\times 10^6$) in Prozent der unbehandelten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Therapie mit Obinutuzumab in diversen Konzentrationen. Die schwarzen Linien zeigen die Standardabweichung der Triplikate an.

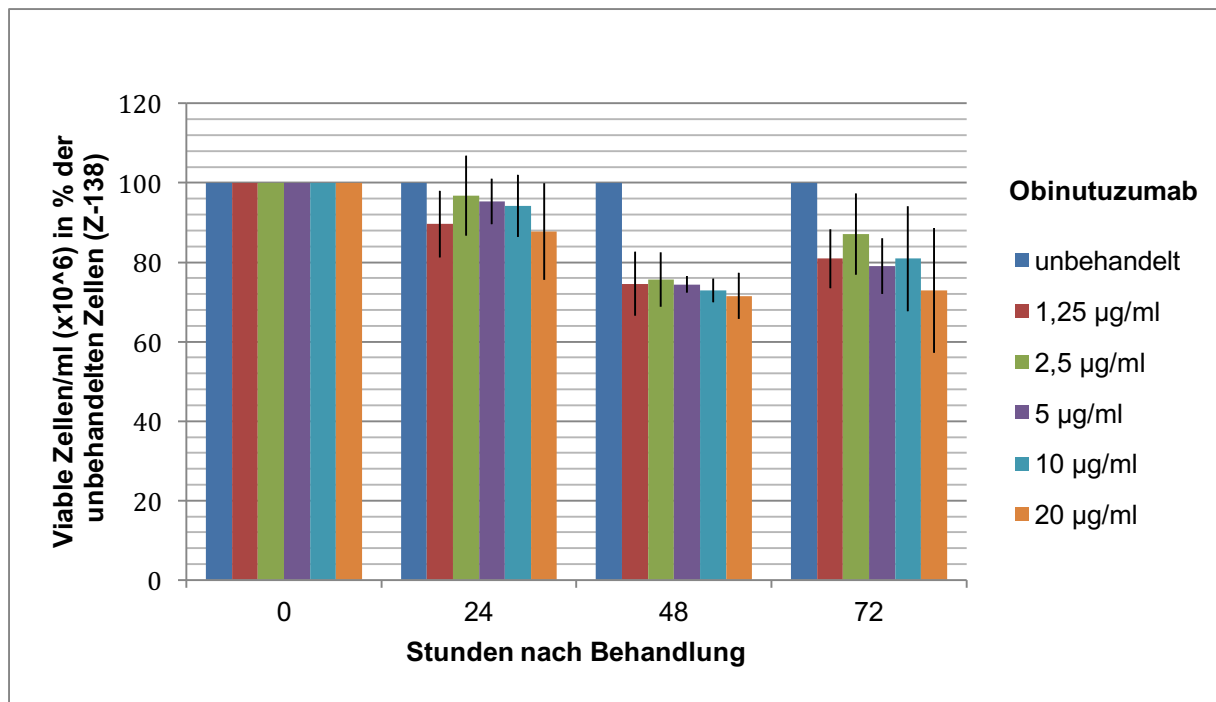


Abbildung 4d: MZL-Zelllinie **Z-138**: Lebende Zellen pro Milliliter ($\times 10^6$) in Prozent der unbehandelten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Therapie mit Obinutuzumab in diversen Konzentrationen. Die schwarzen Linien zeigen die Standardabweichung der Triplikate an.

5.1.2 Dosisfindung: Rituximab

Die Dosis für die Rituximab Mono- und Kombinationsexperimente erfolgte nach Vorarbeiten einer anderen Doktorandin (Kristina Decheva) unseres Labors. Des Weiteren wurden für die Microarray-Analysen gleiche Dosen für die Mono- und Kombinationsexperimente der beiden mAk eingesetzt. Hierfür erfolgten die Experimente mit 10 µg/ml. Diese Dosis wurde ebenfalls bei vergleichbaren Experimenten von Franke et al. eingesetzt (Franke, *et al* 2011). So lässt sich eine bessere Vergleichbarkeit der generierten Daten erzielen.

5.1.3 Mono- und Kombinationsergebnisse der Antikörpertherapie

In vitro Experimente zeigten Zelllinien-spezifische Reaktionen auf jede Behandlung. Obinutuzumab führte zu einer stärkeren Verminderung der Zellviabilität als Rituximab in jeder MZL-Zelllinie. Granta-519 und Rec-1 reagierten am stärksten auf die Monotherapie mit dem neuen monoklonalen Antikörper Obinutuzumab. Die Behand-

lung führte zu einer 65-75%igen Zellreduktion von Granta-519-Zellen und einer 45-50%igen Reduktion bei Rec-1. Eine Reduktion der Zellproliferation von 15-20% wurde für die beiden Zelllinien Jeko-1 und Z-138 erzielt. Der gleiche Versuchsaufbau mit Rituximab zeigte eine weit geringere Reduktion der Zellproliferation. Die Einzelbehandlungen mit Rituximab führten zur Reduktion der Zellzahlen um 21% bei Granta-519, 17% bei Rec-1 und weniger als 5% bei Jeko-1 sowie Z-138.

In einem weiteren Versuchsaufbau erfolgten die Wiederholungen der Einzelansätze mit einer Konzentration von 10 µg/ml als auch die Ergänzung um die Kombination beider Anti-CD20-Antikörper. Kombinationsexperimente ließen eine kompetitive Bindung der beiden Antikörper aufgrund der sich überlappenden Epitope auf den Zielzellen vermuten (Niederfellner, *et al* 2011). Berechnungen des fraktionellen Produkts ergaben, dass die Kombinationsexperimente aus Obinutuzumab plus Rituximab eine geringere Zytotoxizität erzielten als die Monotherapie mit Obinutuzumab. Die Kalkulationen des fraktionellen Produkts zeigen einen klaren Antagonismus bezüglich der Wirkung auf alle untersuchten Zelllinien. In diesen Experimenten zeigte sich erneut das eindrucklichste Ergebnis für Granta-519. Die Monotherapie mit Obinutuzumab führte zur Reduktion der Zellzahl um ca. 70%, die Therapie mit Rituximab und der Kombination um ca. 15%. Daraus ergibt sich bei der Berechnung des fraktionellen Produkts ein Wert von -0,56 – ein klarer Antagonismus. Die zweit-sensibelste Zelllinie Rec-1 wurde in dem entsprechenden Experiment durch die Monobehandlung mit Obinutuzumab um ca. 50% reduziert. Die Kombination und die Einzeltherapie mit Rituximab erzielten eine Reduktion von ungefähr 17%. Auch hier ließ sich ein ausgeprägter Antagonismus mit einem Wert von -0,44 berechnen. Weniger ausgeprägte Ergebnisse zeigten die Zelllinien Jeko-1 und Z-138. Jeko-1 wurde hier um ca. 15% reduziert, die Kombination und die Monotherapie mit Rituximab führten zur Redukti-

on von unter 5%. Bei einem fraktionellen Produkt von -0,14 konnte hier ebenfalls ein Antagonismus nachgewiesen werden. Bei Z-138 führte die Kombination beider Antikörper zu Reduktionen der Zellproliferation um ca. 4% und bei der Monotherapie mit Obinutuzumab um 17%. Ein Antagonismus konnte hier bei einem Wert von -0,18 gezeigt werden. Die gesammelten Ergebnisse nach 72 Stunden Inkubation sind in Abbildung 5a dargestellt.

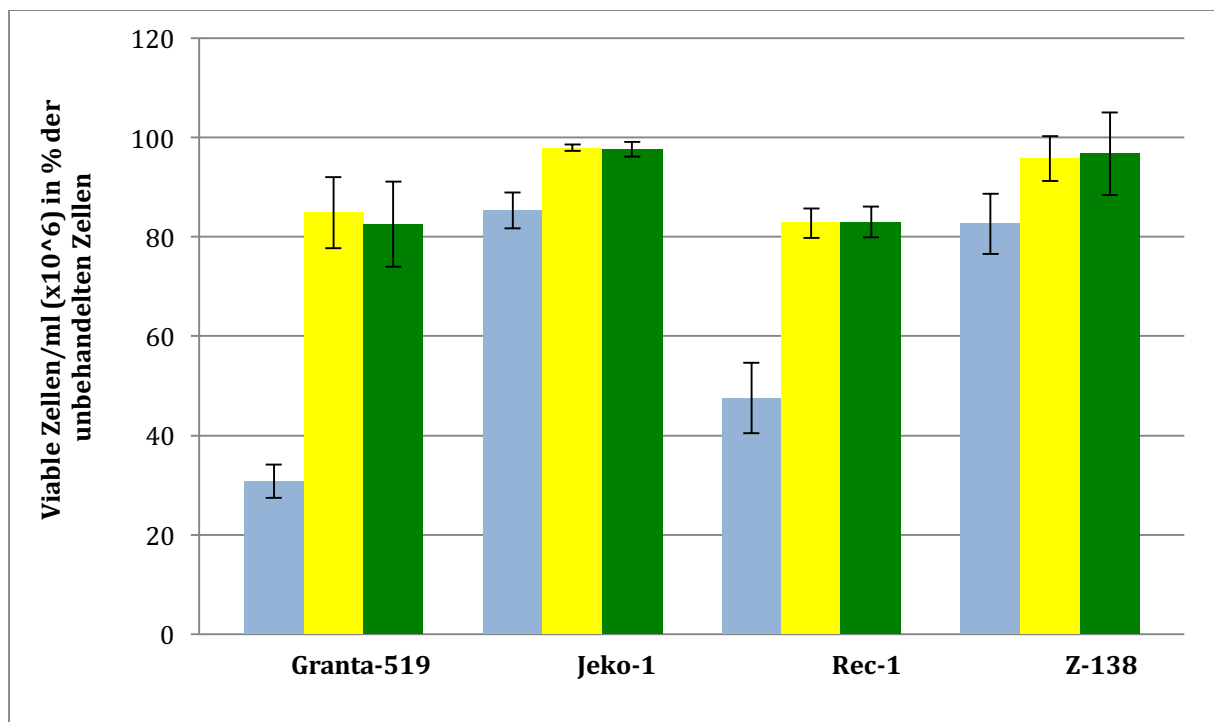


Abbildung 5a: *In vitro* Reduktion der Zellviabilität in Prozent der unbehandelten Zellen in den Zelllinien Granta-519, Jeko-1, Rec-1 und Z-138 nach Obinutuzumab (hell-blau), Rituximab (gelb) und Kombinations-Therapie (grün) bei gleichen Konzentrationen (10 µg/ml) dargestellt 72 Stunden nach Behandlung. Die senkrechten Linien zeigen die Standardabweichung der Triplikate in Prozent an.

Als Kontrollzelllinie wurde Karpas 422, ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom verwendet. Nach 72 Stunden Therapie kommt es zu einer Zellreduktion von ungefähr 10% nach Rituximab oder Obinutuzumab-Monotherapie und nach der Kombination beider Antikörper. Die „Fraction of Product“ Berechnung bei den Versuchsansätzen mit der Kontrollzelllinie Karpas 422 zeigt weder einen synergistischen noch

einen antagonistischen Effekt bei der Kombination. Abbildung 5b zeigt die Reduktion der Zellproliferation bei Karpas 422.

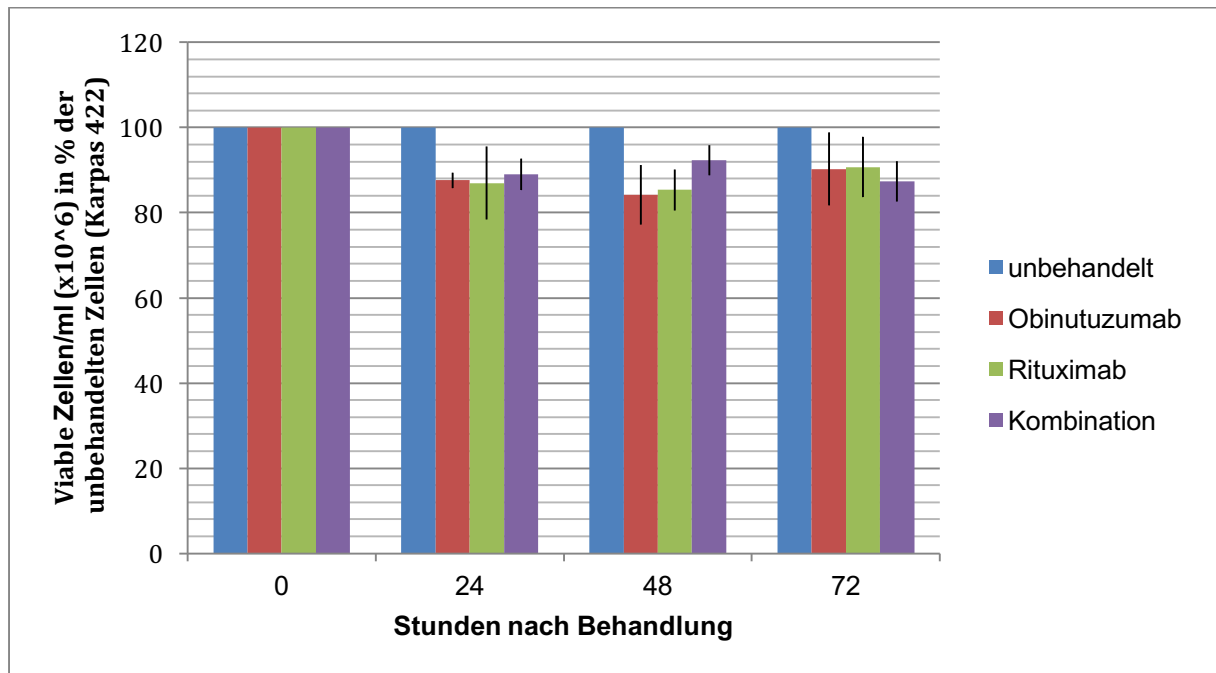


Abbildung 5b: *In vitro* Reduktion der Zellviabilität in Prozent der unbehandelten Zellen in der Kontrollzelllinie **Karpas 422** nach Obinutuzumab (rot), Rituximab (grün) und Kombinations-Therapie (lila) bei gleichen Konzentrationen (10 µg/ml) dargestellt 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung. Die senkrechten Linien zeigen die Standardabweichung in Prozent an.

5.1.4 Kombinationsergebnisse der Antikörpertherapie: simultane vs. sequentielle Behandlung

Ergänzend zu den oben beschriebenen Ergebnissen der Einzel- und Kombinations-experimente mit beiden mAk erfolgten weitere Kombinationsexperimente mit einem veränderten Versuchsaufbau. Basierend auf der Erkenntnis, dass eine Kombination der beiden mAk bei gleicher Konzentration und simultaner Applikation zu Rituximab-ähnlichen Resultaten führt, wurde der Versuchsaufbau wie folgt verändert: Die MZL-Zelllinien Rec-1 und Granta-519 wurden mit Obinutuzumab und Rituximab mit 1 µg/ml monotherapiert. Hierbei zeigten sich entsprechende Zellreduktionen wie in den vorher beschriebenen Experimenten mit 10 µg/ml. Des Weiteren erfolgte in je einem

separaten Versuchsaufbau die simultane Therapie mit Obinutuzumab mit 1 µg/ml und Rituximab mit 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml. Hierbei zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse bei Granta-519 und Rec-1. Bei Rec-1 kommt es bei der Kombination (1 µg/ml zu 0,1 µg/ml) zu einer intermediären Zellreduktion, die derer der 1:1 – Kombination ähnelt. Bei Granta-519 lässt sich dieses Phänomen nicht reproduzieren. Hier führt die zehnfach höhere Dosierung von Obinutuzumab zu einem vergleichbaren Ergebnis wie in der Monotherapie. Das gleiche gilt für die Experimente mit der hundertfach erhöhten Konzentration.

Des Weiteren erfolgten Experimente mit zeitversetzter Applikation der Substanzen. Hierdurch sollte geklärt werden, ob der Faktor Zeit einen Einfluss auf die Zellreduktion haben könnte. Zunächst wurden die Zellen mit Obinutuzumab und anschließend nach vier Stunden mit Rituximab behandelt. Der gleiche Versuchsaufbau wurde mit der umgedrehten Reihenfolge wiederholt. Es zeigte sich eine geringere Zellzahlreduktion im Vergleich zur Obinutuzumab-Monotherapie bei beiden verwendeten Zelllinien. Tendenziell führte eine Präinkubation mit Rituximab zu dem geringsten Effekt. Die Ergebnisse sind in den beiden Abbildungen 6a und 6b zusammengefasst.

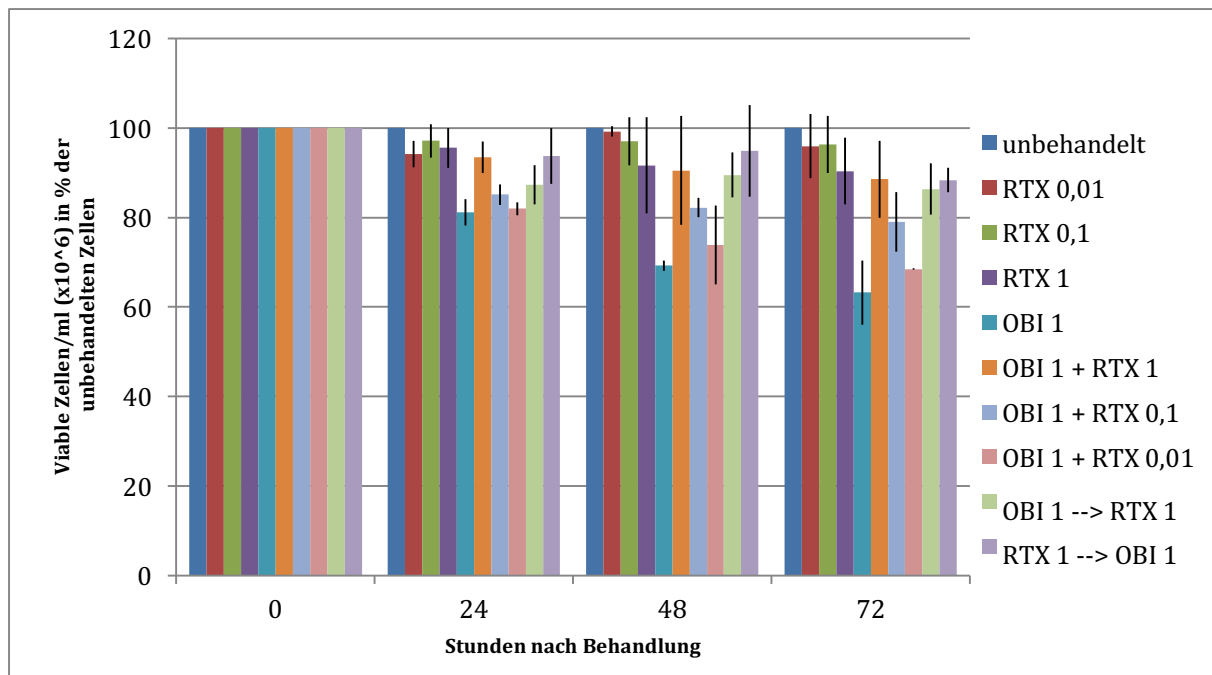


Abbildung 6a: MZL-Zelllinie **Rec-1**: Lebende Zellen pro Milliliter ($\times 10^6$) in Prozent der unbehandelten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Therapie mit Obinutuzumab (OBI) und Rituximab (RTX) in den verschiedenen Konzentrationen (jeweils in $\mu\text{g/ml}$). Die schwarzen Linien zeigen die Standardabweichung der Triplikate an. Hell-Grün (OBI 1 \rightarrow RTX 1): Behandlung mit Obinutuzumab für 4 Stunden, dann Hinzugabe von Rituximab, jeweils mit 1 $\mu\text{g/ml}$. Hell-Lila (RTX 1 \rightarrow OBI 1): Behandlung mit Rituximab für 4 Stunden, dann Hinzugabe von Obinutuzumab, jeweils mit 1 $\mu\text{g/ml}$.

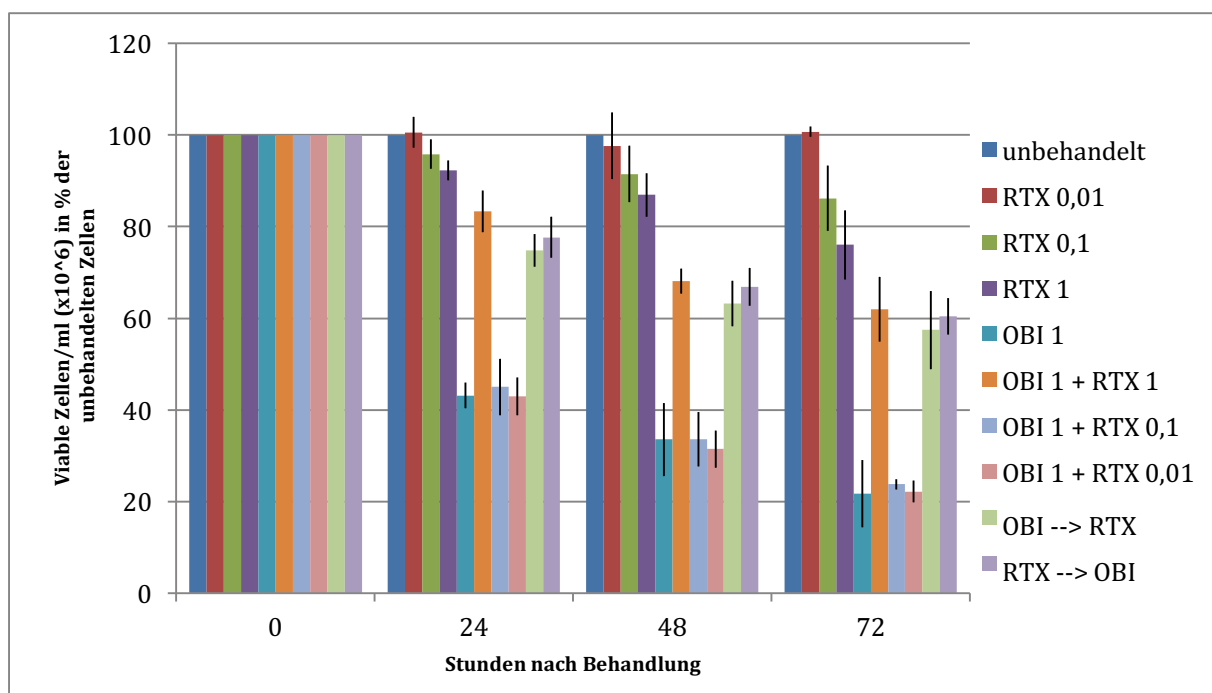


Abbildung 6b: MZL-Zelllinie **Granta-519**: Lebende Zellen pro Milliliter ($\times 10^6$) in Prozent der unbehandelten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Therapie mit Obinutuzumab (OBI) und Rituximab (RTX) in den verschiedenen Konzentrationen (jeweils in $\mu\text{g/ml}$). Die schwarzen Linien zeigen die Standardabweichung der Triplikate an. Hell-Grün (OBI 1 \rightarrow RTX 1): Behandlung mit Obinutuzumab für 4 Stunden, dann Hinzugabe von Rituximab, jeweils mit 1 $\mu\text{g/ml}$. Hell-Lila (RTX 1 \rightarrow OBI 1): Behandlung mit Rituximab für 4 Stunden, dann Hinzugabe von Obinutuzumab, jeweils mit 1 $\mu\text{g/ml}$.

5.2 Microarray-Analysen

5.2.1 Deregulierte Gene der Obinutuzumab- und Rituximab-Monotherapien

Um die zugrunde liegenden molekularen Signalwege zu identifizieren, die für die unterschiedlichen Wirkungsstärken der beiden Antikörper verantwortlich sind, erfolgte die Durchführung von Microarray-Analysen. Die MZL-Zelllinien Jeko-1, Rec-1 und Z-138 zeigten nach Obinutuzumab- oder Rituximab-Monotherapien spezifische Änderungen der Transkription. Analysen der Zelllinie Granta-519 waren nicht möglich, da alle Zellen nach 4h Inkubation abgetötet waren. Die Microarray-Analysen ergaben, dass 42 Gene in allen Zelllinien durch die Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Obinutuzumab in ihrer Expression verändert wurden. 34 Gene wurden hochreguliert und 8 Gene wurden runterreguliert. Die Rituximab-Monotherapien unterschieden eine größere Anzahl an deregulierten Genen: von den insgesamt 50 identifizierten Genen waren 40 hoch- und zehn herunterreguliert.

5.2.2 Vergleich der Transkriptionsveränderungen beider mAk

Die IPA™ (Redwood City, USA) Analyse identifizierte eine Gruppe von 71 unterschiedlichen Genen, die durch beide mAk in den Zelllinien Jeko-1, Rec-1 und Z-138 dereguliert wurden. Interessanterweise teilten sich beide Einzelbehandlungen nur 21 Gene, die verändert wurden. Weitere Vergleichsanalysen zeigten, dass die Einzelbehandlung mit Obinutuzumab eine Subgruppe von 21 Genen veränderte, die nicht von Rituximab beeinflusst wurden. Im Gegensatz dazu verursachte die Einzeltherapie mit Rituximab eine Deregulierung von 29 spezifisch veränderten Genen. Diese Ergebnisse weisen auf ein gemeinsames Muster der Expressionsänderungen nach der Bindung von monoklonalen Anti-CD20 Antikörpern hin. Aber sie zeigen auch signifikante Unterschiede der Transkriptionsänderungen zwischen Typ 1 und Typ 2 mAk auf. Zusätzlich wurden die veränderten Gene analysiert und nach Zellkompar-

timent und Funktion gruppiert. Die Analysen wiesen darauf hin, dass viele der Gene mit „Stress-Signalisierung“, „Zelltod“ und „Immunantwort“ sowie anderen funktionellen Signaltransduktionskaskaden assoziiert waren.

5.2.3 Gemeinsam deregulierte Gene der Monotherapien

Die IPA™ (REDWOOD CITY, USA) Analysen der Rituximab und Obinutuzumab Monotherapien identifizierten 21 gemeinsam deregulierte Gene in den Zelllinien Je-ko-1, Rec-1 und Z-138. 19 dieser Gene wurden hochreguliert und 2 herunterreguliert. So wie bereits erwartet, wurden insgesamt 19 dieser Gene ebenfalls durch die Kombinationstherapie dereguliert. Die hochregulierten Gene *CCL3* und *CCL4* kodieren für Zytokine. Ein weiteres hochreguliertes Gen ist *EGR1*, das für ein Zinkfingerprotein kodiert (Gibbs, *et al* 2008b). Das nach beiden Monotherapien hochregulierte *RGS1* gehört zum G-Protein-gekoppeltem Rezeptor-Signalweg. *DUSP2*, auch bekannt unter der Bezeichnung *PAC1*, ist ein hochreguliertes Gen im ERK/MAPK Signalweg (Yin, *et al* 2003). Das Gen für eine weitere Phosphatase *DUSP5*, wurde ebenfalls hochreguliert. Des Weiteren wurden auch die Gene, die für das Zytokin *CSF-1*, die Transkriptionsregulatoren *EGR2*, *EGR3*, *TFEC*, den Liganden-abhängigen nukleären Rezeptor *NR4A3*, die Histone *HIST1H1D*, *HIST1H2AJ*, *HIST1H3A*, das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (*MAP2*), als auch *RGS2* und die für die Plasmamembranmoleküle *SPRED1*, *SPRY2* und *AMIGO2* kodieren, hochreguliert. Die Gene für den Transporter *SLC34A3* und *MALAT1* wurden herunterreguliert. Die gemeinsam deregulierten Gene der Obinutuzumab- oder Rituximab-Monotherapien sind in Tabelle 2 nach Zellkompartiment und Funktion gegliedert. Die Spalten 5 und 6 zeigen die maximalen Expressionswerte nach der jeweiligen Therapie an.

Symbol	Entrez Gen-Name	Zellkompartiment	Funktion	Max. Expressionswert– Obinutuzumab	Max. Expressionswert– Rituximab
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	extrazellulärer Raum	Zytokin	5,94	3,61
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4			6,00	2,21
CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)			2,03	1,39
MAP2	microtubule-associated protein 2	Zytoplasma	andere	1,28	1,15
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	Nukleus	Liganden-abhängiger nukleärer Rez.	4,02	1,51
HIST1H1D	histone cluster 1, H1d		andere	1,5	2,11
HIST1H2AJ	histone cluster 1, H2aj			2,05	2,11
HIST1H3A	histone cluster 1, H3a			1,61	1,85
RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa			3,19	1,22
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)			-2,8	-2,57
DUSP2	dual specificity phosphatase 2		Phosphatase	4,38	1,31
DUSP5	dual specificity phosphatase 5			3,76	1,08
EGR1	early growth response 1		Transkriptionsregulator	7,36	3,72
EGR2	early growth response 2			4,42	6,18
EGR3	early growth response 3			6,12	6,78
TFEC	transcription factor EC			1,79	1,17
AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2	Plasma-membran	andere	3,2	3,19
RGS1	regulator of G-protein signaling 1			3,19	11,91
SPRED1	sprouty-related, EVH1 domain containing 1			1,19	1,16
SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila)			1,09	1,5
SLC34A3	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 3		Transporter	-1,45	-1,2

Tabelle 2: Gemeinsam deregulierte Gene der Obinutuzumab- oder Rituximab-Monotherapien

Mittels der IPA™ (REDWOOD CITY, USA) Analyse lassen sich die modifizierten Gene zu einem Netzwerk zusammenfügen. Die Verbindungslinien zeigen in der Literatur vorbeschriebene und publizierte Interaktionen an. Anhand der Analyse entsteht folgendes Netzwerk der gemeinsam deregulierten Gene. (Abbildung 7)

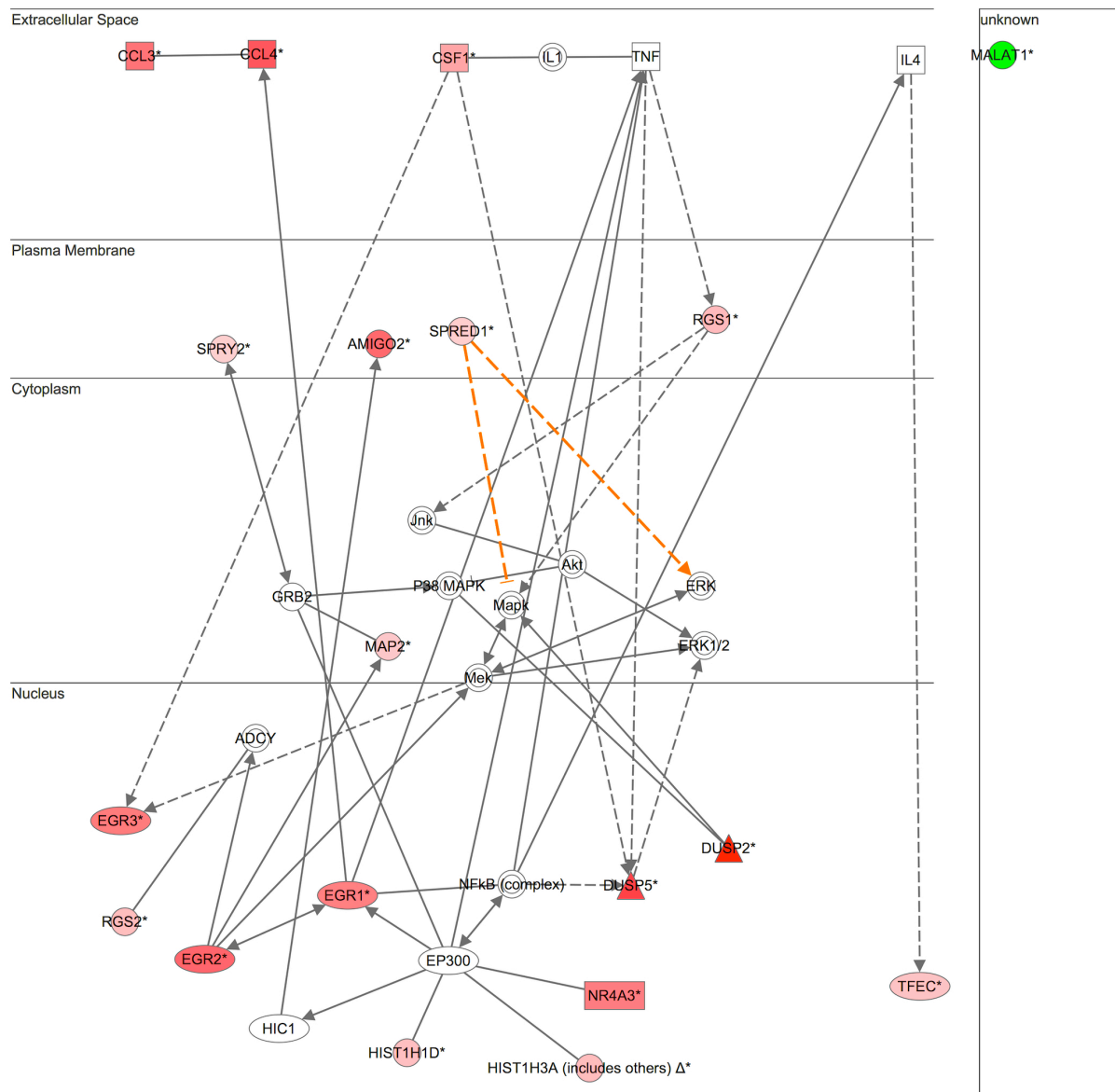


Abbildung 7: Netzwerk der gemeinsam deregulierten Gene nach den Monotherapien mit Obinutuzumab oder Rituximab. IPA™ (REDWOOD CITY, USA)-Netzwerk Gene nach Rituximab- oder Obinutuzumab-Monotherapie mit 10 µg/ml nach 4h. Rot: hochregulierte Gene; Grün: herunterregulierte Gene; Weiß: nicht regulierte Gene. Die Intensität der Farbsättigung gibt den „fold change“ - Wert an (dunkel: höherer „fold change“, hell: geringerer „fold change“). Die durchgezogenen Linien geben direkte Interaktionen an. Die orangen und/oder gestrichelten Linien geben indirekte Interaktionen an.

5.2.4 Ausschließlich nach Obinutuzumab-Monotherapie deregulierte Gene

Wie bereits vorher genannt, wurden 21 Gene identifiziert, die nur durch die Obinutuzumab-Monotherapie in den Zelllinien Jeko-1, Rec-1 und Z-138 verändert wurden. 15 dieser Gene wurden hochreguliert, 6 herunterreguliert. Diese bekannten Gene sind Teil mehrerer kanonischer Signalwege. *FOS* (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) zeigt eine maximale Expressionswertveränderung von 6,13. Ebenfalls hochreguliert werden die Gene, die für die im Zytoplasma befindlichen Moleküle *SOCS3* und *IER2*, als auch für die sich im Extrazellulärraum befindlichen Produkte *PDGFA* und *DKK2* und die nukleären Bestandteile *NAB2*, *NFATC1*, *NFKBIE*, *ZBTB24*, den Plasmamembranbestandteil *ANXA1*, sowie Transmembranrezeptoren *CD69*, *ICAM1* und *IL21R* kodieren. Des Weiteren erfolgte die positive Deregulierung von *MIR155HG* und *TMEM107*. Das am stärksten negativ deregulierte Gen war *FAM65B*. Weitere Gene, die für die Enzyme *PLOD2* und *PPIL4*, *C16orf54*, den Transkriptionsfaktor *IKZF2* und das Zyklin G2 (*CCNG2*) kodieren, wurden herunterreguliert. Die Gene der Obinutuzumab-Monotherapie sind in Tabelle 3 nach Zellkompartiment und Funktion gegliedert. Die Spalte 5 zeigt den maximalen Expressionswert (fold change) nach der Therapie an.

Symbol	Entrez Gen-Name	Zellkompartiment	Funktion	Max. Expressionswert (fold change)
IER2	immediate early response 2	Zytoplasma	andere	1,82
PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2		Enzym	-1,14
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3		Phosphatase	1,86
C16orf54	chromosome 16 open reading frame 54	extrazellulärer Raum	andere	-1,21
DKK2	dickkopf 2 homolog (Xenopus laevis)			1,01
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide		Wachstumsfaktor	1,36
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Nukleus	Transkriptions-Regulator	6,13

IKZF2	IKAROS family zinc finger 2 (Helios)			-1,1
NAB2	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2)			1,86
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1			1,08
NFKBIE	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon			1,99
PPIL4	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4		Enzym	-1,18
CCNG2	cyclin G2		andere	-1,04
ZBTB24	zinc finger and BTB domain containing 24			1,21
ANXA1	annexin A1	Plasma-membran	andere	1,78
CD69	CD69 molecule			2,0
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	Plasma-membran	Transmembran-Rezeptor	1,22
IL21R	interleukin 21 receptor			1,6
MIR155HG	MIR155 host gene (non-protein coding)	unbekannt	andere	1,84
TMEM107	transmembrane protein 107	unbekannt	andere	1,84
FAM65B	family with sequence similarity 65, member B	unbekannt	andere	-1,24

Tabelle 3: Ausschließlich nach Obinutuzumab Monotherapie deregulierte Gene

Mittels der IPA™ (REDWOOD CITY, USA) Analyse lassen sich die modifizierten Gene zu einem Netzwerk zusammenfügen. Die Verbindungslinien zeigen in der Literatur vorbeschriebene und publizierte Interaktionen an. Anhand der Analyse entsteht folgendes Transduktionsnetzwerk der ausschließlich durch Obinutuzumab deregulierten Gene (Abbildung 8).

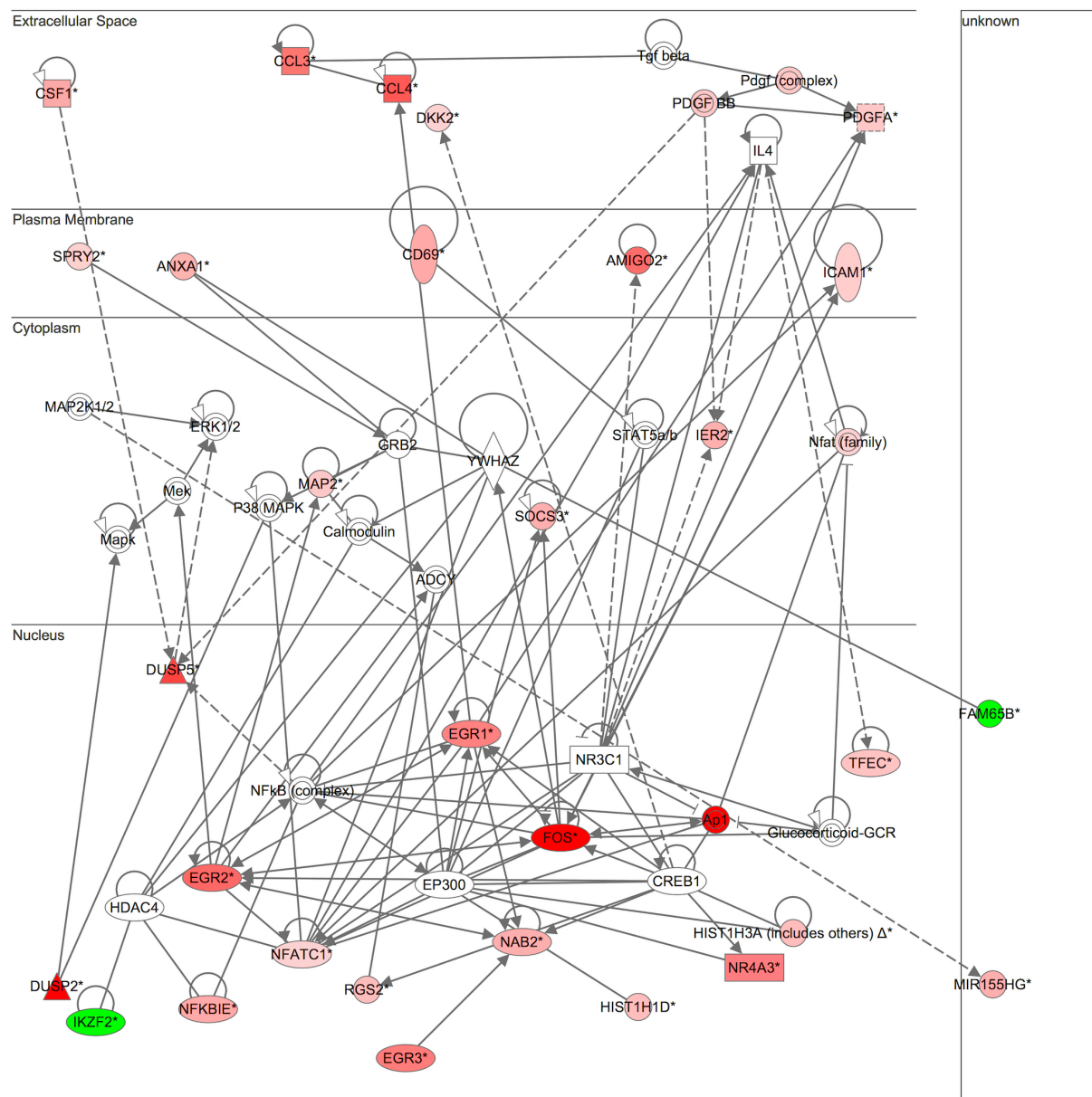


Abbildung 8: Ausschließlich nach Obinutuzumab-Monotherapie deregulierte Gene. IPA™ (REDWOOD CITY, USA)-Netzwerk Gene nach Obinutuzumab-Monotherapie mit 10 µg/ml nach 4h. Rot: hochregulierte Gene; Grün: herunterregulierte Gene; Weiß: nicht regulierte Gene. Die Intensität der Farbsättigung gibt den „fold change“-Wert an (dunkel: höherer „fold change“, hell: geringerer „fold change“). Die durchgezogenen Linien geben direkte Interaktionen an. Die gestrichelten Linien geben indirekte Interaktionen an.

5.2.5 Ausschließlich nach Rituximab-Monotherapie deregulierte Gene

Die Einzelbehandlung mit Rituximab erbrachte 29 veränderte Gene bei Jeko-1, Rec-1 und Z-138, die nicht nach Obinutuzumab-Behandlung reguliert wurden (Tabelle 4). Diese Gene sind Bestandteile verschiedener kanonischer Signaltransduktionsketten. Die IPA™ (REDWOOD CITY, USA) Analysen zeigen eine Herunterregulierung der

Gene *BCL2A1*, der Enzyme *TRIM2*, *IFIH1*, der Transkriptionsregulatoren *NFKBID*, *RELB* und *TP63*, des Plasmamembranbestandteils *NINJ1* und der Phosphatase *PPP2R4*. Hochreguliert wurden die Gene, die für die sich im Zytoplasma befindlichen *DCAF12* und *LPL*, als auch die Heatshockproteine *HSPA1A/HSPA1B* und das Enzym *RHEBL1*, sowie die Kinase *CRIM1*, das Zytokin *SPRED2* und die sich im Extrazellulärraum befindlichen *COL4A2* und *WNT3* kodieren. Ebenso erfolgte eine positive Deregulierung für den Liganden-abhängigen Rezeptor *ESRRG* und die Transkriptionsregulatoren *SOX11* und *RFX3*. Weitere hochregulierte Gene sind *CHL1*, *FAIM3*, *LILRA4*, *LY9*, die Transporter *OCA2*, *SLC38A1* und das Histon *HIST1H2AG*, sowie *MBNL2*, *OTUD1*, *UBALD2*. Die Gene der Rituximab-Monotherapie sind in Tabelle 4 nach Zellkompartiment und Funktion gegliedert. Die Spalte 5 zeigt den maximalen Expressionswert (fold change) nach der Therapie an.

Symbol	Entrez Gen-Name	Zellkompartiment	Funktion	Max. Expressionswert (fold change)
BCL2A1	BCL2-related protein A1	Zytoplasma	andere	-2,17
DCAF12	DDB1 and CUL4 associated factor 12			1,07
HSPA1A/ HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1A			1,15
LPL	lipoprotein lipase			1,49
RHEBL1	Ras homolog enriched in brain like 1		Enzym	1,39
TRIM2	tripartite motif containing 2			-1,21
PPP2R4	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4		Phosphatase	-1,18
CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	Extrazellulärer Raum	Kinase	1,19
SPRED2	sprouty-related, EVH1 domain containing 2		Zytokin	2,24
COL4A2	collagen, type IV, alpha 2		andere	1,33
WNT3	wingless-type MMTV integration site family, member 3			2,1
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	Nukleus	Enzym	-1,1

ESRRG	estrogen-related receptor gamma		Liganden-abhängiger nukleärer Rezeptor	1,53
NFKBID	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, delta		Transkriptions-Regulator	-1,16
RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B			-1,41
RFX3	regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)			1,08
SOX11	SRY (sex determining region Y)-box 11			1,35
TP63	tumor protein p63			-2,73
CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	Plasmamembran	andere	1,34
FAIM3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3			1,09
LILRA4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 4			2,24
LY9	lymphocyte antigen 9			6,59
NINJ1	ninjurin 1			-1,09
OCA2	oculocutaneous albinism II		Transporter	3,28
SLC38A1	solute carrier family 38, member 1			1,11
HIST1H2AG	--	unbekannt	andere	1,4
MBNL2	muscleblind-like splicing regulator 2			1,01
OTUD1	OTU domain containing 1			1,11
UBALD2	UBA-like domain containing 2			1,3

Tabelle 4: Ausschließlich nach Rituximab-Monotherapie deregulierte Gene

Mittels der IPA™ (REDWOOD CITY, USA) Analyse lassen sich die modifizierten Gene zu einem Netzwerk zusammenfügen. Die Verbindungslinien zeigen in der Literatur vorbeschriebene und publizierte Interaktionen an. Anhand der Analyse entsteht folgendes Transduktionsnetzwerk der ausschließlich durch Rituximab deregulierten Gene (Abbildung 9).

Rituximab-Monotherapien insgesamt 29 gemeinsam deregulierte Gene haben, wohingegen sich die Obinutuzumab-Monobehandlungen nur 21 gemeinsam deregulierte Gene mit den Kombinationen teilen. Weitere Auswertungen der Daten ergaben, dass 16 Gene gemeinsam ausschließlich nur von den Rituximab-Monotherapien und den Kombinationen dereguliert wurden. Im Gegensatz dazu zeigten die Analysen, dass nur 2 Gene ausschließlich von Obinutuzumab und der Kombination verändert wurden. Diese Ergebnisse weisen auf ein Rituximab-ähnliches Expressionsmuster der Kombinationsexperimente hin.

Symbol	Entrez Gen-Name	Zellkompartiment	Funktion	Max. Expressionswert (fold change)
BCL2A1	BCL2-related protein A1	Zytoplasma	andere	-1,29
KLHL36	kelch-like 36 (Drosophila)		andere	-1,28
ITPKB	inositol-trisphosphate 3-kinase B		Kinase	1,14
SMG1	smg-1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (C. elegans)			1,04
RHEBL1	Ras homolog enriched in brain like 1		Enzym	1,35
LPL	lipoprotein lipase			1,39
PPP2R4	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4		Phosphatase	-1,07
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	Extrazellulärer Raum	Zytokin	3,77
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4			2,25
CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)			1,98
COL4A2	collagen, type IV, alpha 2		andere	1,21
WNT3	wingless-type MMTV integration site family, member 3			1,57
CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)		Kinase	-1,26
DUSP2	dual specificity phosphatase 2	Nukleus	Phosphatase	1,42
DUSP5	dual specificity phosphatase 5			1,17
EGR1	early growth response 1		Transkriptions-Regulator	2,74
EGR2	early growth response 2			5,25

EGR3	early growth response 3			7,18
HIST1H1D	histone cluster 1, H1d		andere	1,45
HIST1H2AJ	histone cluster 1, H2aj			1,21
HIST1H3A	histone cluster 1, H3a			2,01
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1			-1,47
CDC27	cell division cycle 27 homolog (S. cerevisiae)			1,22
RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa			1,2
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)			1,46
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1			1,07
NFKBID	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, delta		Transkriptions-Regulator	-1,4
RFX3	regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)			1,0
TFEC	transcription factor EC			1,27
THRAP3	thyroid hormone receptor associated protein 3			1,04
TP63	tumor protein p63			-1,23
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3		Liganden-abhängiger nukleärer Rez.	1,39
AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2	Plasma-membran	andere	3,58
CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)			1,07
FAIM3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3			1,2
LILRA4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (member 4)			1,13
LY9	lymphocyte antigen 9			5,6
OCA2	oculocutaneous albinism II		Transporter	2,01
RGS1	regulator of G-protein signaling 1		andere	11,24
SPRED1	sprouty-related, EVH1 domain containing 1			1,49
SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila)			1,81
OTUD1	OTU domain containing 1	unbekannt	andere	1,14
TMEM107	transmembrane protein 107			1,19

Tabelle 5: Durch die Kombination von Obinutuzumab und Rituximab deregulierte Gene in den Zelllinien Jeko-1, Rec-1, Z-138.

5.2.7 Zelllinienspezifischer Vergleich nach den Monotherapien

Es wurden die Transkriptionsveränderungen der einzelnen Zelllinien analysiert. Dafür wurden die sensiblen mit den weniger empfindlichen Zelllinien nach beiden Therapien miteinander verglichen. So reagierte Rec-1 nach Obinutuzumabgabe mit einer Reduktion der Zellproliferation auf 45-50%. Rituximab bewirkte nur eine Reduktion von 17%. Beim Vergleich der beiden Behandlungen von Rec-1 konnte die Microarray-Analyse 14 Gene, die nur durch Obinutuzumab und 12 Gene, die nur durch Rituximab dereguliert wurden, identifizieren. Jedoch teilten sich beiden Therapien fünf gemeinsam veränderte Gene (Tabelle 6 und 7).

Symbol	Entrez Gen-Name	Zellkompartiment	Funktion	Expressionswert (fold change)
PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	Zytoplasma	Enzym	-1,14
C16orf54	chromosome 16 open reading frame 54	Extrazellulärer Raum	andere	-1,21
DKK2	dickkopf 2 homolog (Xenopus laevis)			1,01
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide		Wachstumsfaktor	1,36
CCNG2	cyclin G2	Nukleus	andere	-1,04
ZBTB24	zinc finger and BTB domain containing 24			1,1
EGR3	early growth response 3		Transkriptions-Regulator	2,05
IKZF2	IKAROS family zinc finger 2 (Helios)			-1,1
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1			1,08
NFKBIE	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon			1,99
PPIL4	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4		Enzym	-1,18
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	Plasma-membran	Transmembran-Rezeptor	1,22
IL21R	interleukin 21 receptor			1,6
FAM65B	family with sequence similarity 65, member B	unbekannt	andere	-1,24

Tabelle 6: Ausschließlich nach Obinutuzumab-Monotherapie deregulierte Gene im Vergleich zur Rituximab-Monotherapie in der MZL Zelllinie Rec-1

Symbol	Entrez Gen-Name	Zellkompartiment	Funktion	Expressionswert (fold change)
DCAF12	DDB1 and CUL4 associated factor 12	Zytoplasma	andere	1,07
LPL	lipoprotein lipase		Enzym	1,13
CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	Extrazellulärer Raum	Kinase	1,19
WNT3	wingless-type MMTV integration site family, member 3		andere	1,04
EGR2	early growth response 2	Nukleus	Transkriptions-Regulator	4,4
SOX11	SRY (sex determining region Y)-box 11			1,21
ESRRG	estrogen-related receptor gamma		Liganden-abhängiger nukleärer Rezeptor	1,53
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)		andere	-2,59
CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	Plasmamembran	andere	1,04
FAIM3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3			1,09
OCA2	oculocutaneous albinism II		Transporter	1
SLC38A1	solute carrier family 38, member 1			1,11

Tabelle 7: Ausschließlich nach Rituximab-Monotherapie deregulierte Gene im Vergleich zur Obinutuzumab-Monotherapie in der MZL Zelllinie Rec-1

Die beiden Antikörpertherapien erzielten weniger deutliche Ergebnisse für Z-138 und Jeko-1. Nichtsdestotrotz wurde eine größere Wirkung durch Obinutuzumab erzielt. Die IPA™ (REDWOOD CITY, USA) Vergleichsanalyse der Zelllinie Z-138 zeigte 15 exklusiv regulierte Gene nach Obinutuzumabgabe. Des Weiteren wurden fünf Gene für die Rituximab-Monotherapie, sowie neun gemeinsam regulierte Gene identifiziert (Tabelle 8 und 9).

Symbol	Entrez Gen-Name	Zellkompartiment	Funktion	Expressionswert (fold change)
IER2	immediate early response 2	Zytoplasma	andere	1,82
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3		Phosphatase	1,86
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	Extrazellulärer Raum	Zytokine	5,94
DUSP2	dual specificity phosphatase 2	Nukleus	Phosphatase	4,38
EGR1	early growth response 1		Transkriptionsregulator	7,36
EGR2	early growth response 2			4,42
EGR3	early growth response 3			2,56
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog			6,13
NAB2	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2)			1,86
ZBTB24	zinc finger and BTB domain containing 24		andere	1,21
ANXA1	annexin A1	Plasmamembran	andere	1,78
SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila)			1,09
CD69	CD69 molecule		Transmembranrezeptor	2
MIR155HG	MIR155 host gene (non-protein coding)	unbekannt	andere	1,84
TMEM107	transmembrane protein 107			1,84

Tabelle 8: Ausschließlich nach Obinutuzumab-Monotherapie deregulierte Gene im Vergleich zur Rituximab-Monotherapie in der MZL Zelllinie Z-138

Symbol	Entrez Gen-Name	Zellkompartiment	Funktion	Expressionswert (fold change)
RFX3	regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)	Nukleus	Transkriptions-Regulator	1,08
TP63	tumor protein p63			-1,25
HIST1H2AG	--	unbekannt	andere	1,26
MBNL2	muscleblind-like splicing regulator 2			1,01
UBALD2	UBA-like domain containing 2			1,3

Tabelle 9: Ausschließlich nach Rituximab-Monotherapie deregulierte Gene im Vergleich zur Obinutuzumab-Monotherapie in der MZL Zelllinie Z-138

Bei den Analysen von Jeko-1 wurden insgesamt 30 Gene gefunden, von denen 12 von beiden Behandlungen geteilt wurden. Insgesamt 17 Gene wurden exklusiv durch Rituximab modifiziert, *NFATC 1* nur von Obinutuzumab (Tabelle 10 und 11).

Symbol	Entrez Gen-Name	Zellkompartiment	Funktion	Expressionswert (fold change)
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	Nukleus	Transkriptions-Regulator	1,02

Tabelle 10: Ausschließlich nach Obinutuzumab-Monotherapie dereguliertes Gen im Vergleich zur Rituximab-Monotherapie in der MZL Zelllinie Jeko-1

Symbol	Entrez Gen-Name	Zellkompartiment	Funktion	Expressionswert (fold change)
BCL2A1	BCL2-related protein A1	Zytoplasma	andere	-2,17
HSPA1A/B	heat shock 70kDa protein 1A			1,15
PPP2R4	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4		Phosphatase	-1,18
LPL	lipoprotein lipase		Enzym	1,49
RHEBL1	Ras homolog enriched in brain like 1			1,39
TRIM2	tripartite motif containing 2			-1,21
COL4A2	collagen, type IV, alpha 2	Extrazellulärer Raum	andere	1,02
SPRED2	sprouty-related, EVH1 domain containing 2		Zytokin	2,24
DUSP2	dual specificity phosphatase 2	Nukleus	Phosphatase	1,31
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1		Enzym	-1,1
NFKBID	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, delta		Transkriptions-Regulator	-1,16
RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B			-1,41
CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	Plasmamembran	andere	1,34
LILRA4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 4			1,08
LY9	lymphocyte antigen 9			1,55
NINJ1	ninjurin 1			-1,09
OTUD1	OTU domain containing 1	unbekannt	andere	1,11

Tabelle 11: Ausschließlich nach Rituximab-Monotherapie deregulierte Gene im Vergleich zur Obinutuzumab-Monotherapie in der MZL Zelllinie Jeko-1

Zusammenfassend lässt sich dadurch festhalten, dass Rec-1 und Z-138 empfindlicher gegenüber Obinutuzumab waren als gegenüber Rituximab. Beim Vergleich der exklusiv durch Obinutuzumab veränderten Gene in den Zelllinien Rec-1 und Z-138 wurden die Gene *EGR3* und *ZBTB24* identifiziert. Die beiden sensiblen Zelllinien teilten sich diese veränderten Gene. Somit ergab sich der Hinweis auf einen zielvermittelten Effekt der Antikörpertherapie mit Obinutuzumab.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Transkriptionsregulierungsmuster des Typ I monoklonalen Anti-CD20 Antikörpers Rituximab und des neuen Typ II Anti-CD20 Antikörpers Obinutuzumab an diversen Mantelzelllymphom-Zelllinien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Anti-CD20 Antikörper differente direkte Veränderungen auf Transkriptionsebene bewirken konnten. Monotherapien und Antikörperkombinationsbehandlungen führten zu exklusiv und gemeinsam regulierten Gengruppen in verschiedenen Zelllinien. Diese Antikörper-spezifischen Expressionsmuster nach Obinutuzumab- oder Rituximabtherapie können die molekulare Basis für den überlegenen Effekt von Obinutuzumab gegenüber Rituximab darstellen (Heinrich, *et al* 2015).

6.1 Obinutuzumab und Rituximab: gemeinsame Signalwege

Obwohl beide monoklonalen Antikörper große Gruppen von Genen, die zu diversen Transduktionswegen gehören, deregulierten, zeigte die Analyse, dass sich beide Antikörper 21 gemeinsam modifizierte Gene teilten. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass sich die Wirkmechanismen der Typ I und II Antikörper teilweise überlappen.

Die Gene, die für die beiden Zytokine *CCL3* und *CCL4* kodieren, sind in den Experimenten hochreguliert. Die hochregulierten Gene *CCL3* und *CCL4*, ebenfalls bekannt unter „macrophage inflammatory protein 1 alpha and beta“, sind Teil der Kommunikation zwischen der angeborenen und adaptierten Immunzell- sowie der CCR5-Signaltransduktionswege. Es wird postuliert, dass ihre Genprodukte Teil der Antitumoraktivität der monoklonalen Anti-CD20 Antikörper sind (Cittera, *et al* 2007). Des

Weiteren ist *CCL3* auch in den „TREM1“- und Glukokortikoidrezeptor-Signalwegen involviert. Cittera et al. identifizierten die potente Hochregulation dieser Zytokine nach Rituximabgabe. Diese Zytokine sind vermutlich bei der Aktivierung des angeborenen Immunitätsnetzwerkes, welches für die Eradikation von Lymphomzellen verantwortlich sei, beteiligt (Cittera, et al 2007). Francke et al. konnten zeigen, dass die Behandlung mit Anti-CD20- und B-Zell-Rezeptor-Antikörpern zu einer ähnlichen Deregulation des Transkriptoms bei multiplen Myelom Zelllinien führten. Im Besonderen sei die Hochregulation von *CCL3* und *CCL4* durch die Typ I Anti-CD20- und Anti-BCR-Antikörper zu nennen (Franke, et al 2011). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich der Mechanismus des Zelltods nach Rituximab- oder Obinutuzumabgabe überschneidet und dass der B-Zell-Rezeptor Signaltransduktionsweg involviert ist. So sind Kombinationsexperimente mit Obinutuzumab und monoklonalen anti-BCR Antikörpern notwendig, um einen möglichen additiven Effekt bei der Eradikation von MZL-Zellen bewerten zu können. Des Weiteren wäre eine Kombination mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib, welcher in den B-Zell-Rezeptor Transduktionsweg eingreift, hilfreich, um einen potentiellen Effekt auf MZL-Zelllinien zu ergründen.

Zusätzlich zur *CCL3* und *CCL4* Hochregulierung regulieren beide Antikörperbehandlungen das Tumorsuppressions-Gen *EGR-1* hoch. Es spielt eine Schlüsselfunktion in grundlegenden Zellfunktionen. So ist es Teil von Zelldifferenzierung, Wachstum und Apoptose (Kaufmann, et al 2001, Kaufmann and Thiel 2002, Liu, et al 1998). Das *EGR1*-Gen, das für ein Zinkfingerprotein kodiert, ist Teil der B-Zell-Rezeptor- und CXCR4-Signaltransduktionswege (Gibbs, et al 2008b). Gemeinsam mit *CSF-1* gehört es zum „tissue factor in cancer“- Signalweg. Des Weiteren hebt es in M1 myeloblastischen Leukämie-Zellen einen Block in der myeloischen Differenzierung auf, welcher durch zwei Onkogene vermittelt wird (Gibbs, et al 2008a). Ferner ist

EGR-1 dafür bekannt *Survivin*, ein anti-apoptotisches Molekül, herunter zu regulieren und dadurch Kaspasen-Signale zu induzieren, die in einer Apoptose-Induktion münden (Andersen, *et al* 2007, Chen, *et al* 2010). *Survivin* interagiert mit den Kaspasen 3, 7, 9 und supprimiert dadurch die proapoptotische Transduktionskaskade (Shin, *et al* 2001). Es wurde gezeigt, dass *Survivin* durch siRNA in der MZL-Zelllinie Jeko-1 stillgelegt werden konnte, was wiederum zu einer Verminderung der Proliferation führte (Liang, *et al* 2012). Diese Ergebnisse könnten die molekulare Basis für Kombinationsansätze von Obinutuzumab oder Rituximab mit *Survivin*-siRNA sein.

Abgesehen von den oben genannten Genen, führen beide Antikörperbehandlungen zur Deregulation von *DUSP2* (dual specificity phosphate 2), welches ebenfalls unter der Bezeichnung *PAC1* (phosphate of activated cells 1) bekannt ist. Dieses hochregulierte Gen gehört zum ERK/MAPK Signalweg und spielt somit eine wichtige Rolle als Inhibitor von ERK 1/2 in der Wachstumssuppression. Die Hochregulierung wird durch p53 induziert und führt zur Apoptose-Induktion (Yin, *et al* 2003). Abgesehen von diesen deregulierten Genen, die sich beide Antikörpertherapien teilen, ist die Basis der Unterscheidung der Wirkmechanismen des Typ I monoklonalen Antikörpers Rituximab von denen des Typ II mAk Obinutuzumab, das Set der exklusiv veränderten Gene und der von ihnen kodierten Produkte.

6.2 Obinutuzumab Mono-Behandlung: deregulierte Transduktionswege und mögliche Wirkmechanismen

Einzelbehandlungen mit Obinutuzumab induzierten eine Hochregulierung von *AP-1*, welches abgekürzt für das *activator protein-1* steht. Der Transkriptionsfaktor *AP-1*, ein Heterodimer, setzt sich aus *JUN*- (jun proto-oncogene) und *FOS*- (FBJ murine

osteosarcoma viral oncogene homolog) Familienmitgliedern zusammen. Es ist bekannt dafür ein Schlüsselgen bei der Tumorgenese zu spielen und im Generellen bei Apoptose-Induktion, sowie bei Zellüberleben und –proliferation involviert zu sein (Shaulian and Karin 2001).

FOS, ein Gen, das für ein Leucin-Zipper-Protein kodiert, ist ein Regulator der Zellproliferation und –differenzierung, welches ebenfalls mit dem apoptotischen Zelltod assoziiert ist (Shaulian and Karin 2001). Die IPA™ (REDWOOD CITY, USA) Analysen zeigten des Weiteren, dass *FOS* mit *NFATC1* gemeinsam zu den T-Zell-Rezeptor- sowie ERK/MAPK-Signalwegen gehört. Gemeinsam mit den beiden hochregulierten Genen *NFATC1* und *NFKBIE* ist *FOS* Teil des B-Zell-aktivierenden-Faktor Signalwegs, des April-vermittelten Signalwegs und des PI3K-Signalwegs in B-Lymphozyten. Zusätzlich ist es mit *ANXA 1*, *ICAM 1*, *NFATC1* und *NFKBIE* Teil des Glukokortikoid-Rezeptor-Signalwegs.

Im Besonderen ist der Transkriptionsfaktor *AP-1* mit der Induktion von Wachstumsinhibition und Apoptose via Regulierung diverser Gene involviert, die letztendlich zum Zelltod führen. Unter diesen Genen gehören die Kaspasen-getriggerte c-Abl Abspaltung beim multiplen Myelom und die Vitamin E Analog induzierte Apoptose zu den eingehend beschriebenen Zelltodinduktionswegen (Jia, *et al* 2008, Podar, *et al* 2007). Interessanterweise ist eine niedrige *JUN*-Expression beim multiplen Myelom mit einem frühen krankheitsbedingten Tod assoziiert (Chen, *et al* 2010). Chen *et al.* konnten zeigen, dass diese Korrelationen denen der Expression von *EGR1* ähnelten. Eine Herunterregulierung von *EGR1* wurde mit Krankheitsprogression bei multiplen Myelom Patienten assoziiert. Weitere Analysen zeigten, dass *EGR1* ein direktes Zielgen von *JUN* in der Transduktionskaskade ist (Chen, *et al* 2010). So wie bereits oben beschrieben, führt eine Hochregulierung von *EGR1* zu einer Herun-

terregulierung von *Survivin* (Wagner, *et al* 2008). Somit folgt dieser Herunterregulierung von *Survivin* eine Aktivierung der Kaspasen-induzierten Apoptose (Chen, *et al* 2010). Zusammenfassend weisen somit diese Ergebnisse auf eine mögliche Ähnlichkeit der Wirkmechanismen nach Obinutuzumab-Monotherapie beim MZL hin. Zusätzlich konnten Chen *et al.* zeigen, dass *JUN* und *EGR1* Schlüsselgene bei den durch Bortezomib induzierten Apoptose-Transduktionswegen beim multiplen Myelom sind (Chen, *et al* 2010). Diese Ergebnisse sind die molekulare Grundlage, um potentielle additive Effekte einer Kombinationstherapie von Obinutuzumab mit Bortezomib in weiteren Experimenten an MZL-Zelllinien zu untersuchen.

Weitere Ergebnisse weisen auf eine Beeinflussung der NF-kB-Signaltransduktion hin. *NFKBIE* (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon) kodiert ein Protein, welches bekanntermaßen an Komponenten von NF-kB bindet, um den Komplex zur Degradierung zu markieren. Dadurch wird verhindert, dass der NF-kB-Komplex Gene im Nukleus deregulieren könnte, die zu einer Zellproliferation beitragen könnten. Das von *NFKBIE* kodierte Protein, IκB, wird durch IκB-Kinasen (IKK) vermittelte Phosphorylierung deaktiviert (Viatour, *et al* 2005). Die Hochregulierung von *NFKBIE* ist eine potentielle molekulare Erklärung für den Obinutuzumab induzierten Effekt der Zellproliferationsinhibition bei MZL-Zelllinien. Diese Ergebnisse könnten somit die Grundlage für weitere Kombinationsexperimente mit IKK-Inhibitoren und Obinutuzumab sein. Abgesehen von der NF-kB-Signalkaskade ist *NFKBIE* zusammen mit *NFATC1* (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1) in der PI3K-Transduktion involviert. Diese zusätzlichen Erkenntnisse weisen auf die Notwendigkeit weiterer Kombinationsversuche mit PI3K-Inhibitoren, wie zum Beispiel Idealisib, hin, um mögliche additive Effekte mit Obinutuzumab nachzuweisen.

6.3 Rituximab Mono-Behandlung: deregulierte Transduktionswege und mögliche Wirkmechanismen

Die Monobehandlungen der MZL-Zelllinien mit Rituximab zeigten nur einen moderaten Effekt auf die Inhibition der Zellproliferation. Abgesehen von Genen, die auch durch Obinutuzumab reguliert wurden, hatte Rituximab auch einen spezifischen Effekt auf der transkriptionellen Ebene. Interessanterweise könnte der mittelmäßige Effekt von Rituximab zum Teil durch die weitere Induktion des bereits überexprimierten kanonischen WNT/ β -Catenin-Transduktionsweges sein, welcher als ein Schlüsselweg in der MZL-Pathogenese angesehen wird (Perez-Galan, *et al* 2011, Rizzatti, *et al* 2005). Er ist mit der Tumorgenese verschiedener hämatologischer Malignitäten assoziiert worden (Ge and Wang 2010, Gelebart, *et al* 2008). Die Hochregulierung von *WNT3* und *SOX11* könnte auf eine zelluläre Antwort hinweisen, die zu weniger ausgeprägten Resultaten bei der Apoptose-Induktion führen. Ortega-Paino *et al.* zeigten, dass die Inhibition des WNT/ β -Catenin-Transduktionsweges durch siRNA oder Querceptin zu Apoptose und der Induktion reduzierter Proliferation bei MZL Zelllinien führte (Ortega-Paino, *et al* 2008). Weitere Analysen wären nötig um eine potentielle Herunterregulierung des WNT/ β -Catenin-Transduktionsweges nach einer Rituximab-Kombinationstherapie mit siRNA oder Querceptin zu untersuchen.

Des Weiteren induzierte Rituximab eine Herunterregulierung von *BCL2A*, welches zum Apoptose-Signal-Transduktionsweg gehört. *BCL2A* gehört zu einer Gruppe von hämatopoetischen Zelltod-Regulatoren und trägt im NF- κ B Signalweg zum Zellüberleben bei gesunden und Krebszellen bei (Vogler 2012). Es ist gemeinsam mit den ebenfalls herunterregulierten *RELB* und *NFKBID* Teil des NF- κ B-Signalwegs. *BCL2A* ist ein Mitglied der BCL-2-Proteinfamilie, welche mit der Anti-Apoptose von Zellen

assoziiert ist (Lima, *et al* 2011). Die Herunterregulierung von *BCL2A* könnte ein weiterer Weg des durch Rituximab induzierten Zelltodes sein. So argumentiert Vogler, dass die Entwicklung von „small molecule“-Inhibitoren für dieses Zielgen einen Beitrag zur Verbesserung und Erweiterung von Anti-Tumor-Therapien darstellen könnte (Vogler 2012). Weitere Experimente sind nötig um den potentiell additiven Effekt dieser „small molecules“ in Kombination mit Rituximab zu evaluieren. In Zusammenfassung werden so die weniger ausgeprägten *in vitro* Resultate in der Deregulierung der oben beschriebenen Gene repräsentiert.

6.4 Rituximab plus Obinutuzumab: Kombinationsexperimente

Die Kombination der monoklonalen Antikörper Rituximab und Obinutuzumab führte zur Deregulierung von 72 Genen. Interessanterweise zeigte die IPA™ (REDWOOD CITY, USA) Analyse, dass das Expressionsmuster der Kombinationsdaten, dem von Rituximab stark ähnelte. So werden diese Ergebnisse durch die ähnlichen *in vitro* Resultate des durch Rituximab vermittelten Zellsterbens der MZL-Zelllinien gestützt. Es lässt sich somit sagen, dass die Kombination den Ergebnissen der Rituximab-Monotherapie im molekularen Muster und in der Effizienz ähnelt. Dies lässt sich auch in den Ergebnissen der sequentiellen *in vitro* Experimente ablesen. Hier zeigte sich tendenziell ein schwächeres Zellsterben nach Rituximab-Präinkubation und anschließender Obinutuzumab-Hinzugabe. Aufgrund der Tatsache, dass Obinutuzumab und Rituximab nahezu die gleiche Affinität zum humanen CD20-Molekül (K_D Obinutuzumab: 4.0 nM; K_D Rituximab: 4.5 nM) besitzen, ist der *in vitro* Effekt am ehesten im Zusammenhang mit den sich überlappenden Epitopen zu sehen. Niederfellner et al. stellten die Hypothese auf, dass der Überschuss an Bindungsstellen für monoklonale Antikörper vom Typ I zwei verschiedene Gründe haben könnte. Zum

einen könnte ein Überfluss verschiedener CD20 Moleküle, die von einem der beiden Antikörper besetzt werden, dies erklären. Zum Anderen bestünde die Möglichkeit, dass sterische Bindungsorientierungen und verschiedene Winkelkonformationen, sogenannter „elbow-hinges“ (Ellenbogengelenke), eine Erklärung dieses Phänomens darstellen. So wurde ebenfalls bereits diskutiert, dass Typ I CD20-Antikörper zwischen CD20-Tetrameren und Typ II CD Antikörper innerhalb eines Tetramers binden würden (Cragg and Glennie 2004, Klein, *et al* 2013). Hierdurch könnte ein eingeschränktes Obinutuzumab-Bindungsverhalten und den damit schlechteren *in vitro* Resultaten nach Kombinationstherapien erklärt werden. Klein et al. gehen davon aus, dass die unterschiedliche Geometrie der Bindungskomplexe aus CD20-Molekül und entsprechendem Typ I bzw. II Antikörper verantwortlich für die präklinischen Ergebnisse sind (Klein, *et al* 2013).

Diese Ergebnisse sollten Beachtung im klinischen Einsatz finden. Zusammenfassend lässt sich aus klinischer Perspektive sagen, dass diese Ergebnisse daraufhin deuten, dass Kombinationsbehandlungen keinen Nutzen für MZL-Patienten haben würden.

7 Zusammenfassung

Obinutuzumab und Rituximab deregulieren unterschiedliche Gruppen von Genen in MZL-Zelllinien. Obwohl beide mAk spezifisch an das CD20-Epitop binden, werden unterschiedliche Signaltransduktionswege beeinflusst, die die Inhibition der Zellproliferation induzieren. Deshalb bedarf es neuer Kombinationspartner um potentielle additive Effekte in der MZL-Therapie zu finden. Insbesondere konnten die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise für vielversprechende Kombinationsexperimente mit Obinutuzumab aufzeigen. Zu den potentiellen Kombinationspartnern gehören PI3K-Inhibitoren wie Idealisib, Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib oder IKK-Inhibitoren. Die Kombination beider mAk resultierte in einer weniger ausgeprägten Inhibition der Zellproliferation. Zusätzlich zu den geringeren *in vitro* Effekten, zeigen diese Resultate ein Rituximab-ähnliches Expressionsmuster auf transkriptioneller Ebene. Diese Befunde sind vermutlich bedingt durch die überlappenden Bindungsstellen für Typ I und Typ II Anti-CD20 Antikörper auf dem CD20-Epitop. Des Weiteren kommt es aufgrund der inter-tetrameren Bindung von Rituximab an das CD20-Molekül zu einer 2:1 Stöchiometrie des Bindungsverhalten im Vergleich zu Obinutuzumab, welches am ehesten intra-tetramer bindet. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Kombinationstherapie von Obinutuzumab und Rituximab nicht als erfolgsversprechend für MZL-Patienten anzusehen. Patienten, die kürzlich mit Rituximab vorbehandelt wurden, sollten ebenfalls erst mit Obinutuzumab therapiert werden, wenn Rituximab-Spiegel gesunken sind. Diese *in vitro* Resultate und Microarray Deregulierungsmuster könnten einen Hinweis darauf geben Obinutuzumab nicht nach erfolgter Rituximab-Therapie zu verabreichen. Somit ergibt sich ein rationellerer Ansatz für eine potentielle Therapieplanung.

8 Literaturverzeichnis

- Alduaij, W. & Illidge, T.M. (2011) The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? *Blood*, **117**, 2993-3001.
- Alduaij, W., Ivanov, A., Honeychurch, J., Cheadle, E.J., Potluri, S., Lim, S.H., Shimada, K., Chan, C.H., Tutt, A., Beers, S.A., Glennie, M.J., Cragg, M.S. & Illidge, T.M. (2011) Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood*, **117**, 4519-4529.
- Allinne, J., Pichugin, A., Iarovaia, O., Klibi, M., Barat, A., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Markozashvili, D., Petrova, N., Camara-Clayette, V., Ioudinkova, E., Wiels, J., Razin, S.V., Ribrag, V., Lipinski, M. & Vassetzky, Y.S. (2014) Perinucleolar relocalization and nucleolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in mantle cell lymphoma. *Blood*, **123**, 2044-2053.
- Andersen, M.H., Svane, I.M., Becker, J.C. & Straten, P.T. (2007) The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **13**, 5991-5994.
- Ansell, S.M., Inwards, D.J., Rowland, K.M., Jr., Flynn, P.J., Morton, R.F., Moore, D.F., Jr., Kaufmann, S.H., Ghobrial, I., Kurtin, P.J., Maurer, M., Allmer, C. & Witzig, T.E. (2008) Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer*, **113**, 508-514.
- Argatoff, L.H., Connors, J.M., Klasa, R.J., Horsman, D.E. & Gascoyne, R.D. (1997) Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*, **89**, 2067-2078.
- Baldwin, A.S. (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest*, **107**, 241-246.
- Banks, P.M., Chan, J., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Gatter, K., Grogan, T.M., Harris, N.L., Isaacson, P.G., Jaffe, E.S. & et al. (1992) Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol*, **16**, 637-640.
- Beers, S.A., Chan, C.H., French, R.R., Cragg, M.S. & Glennie, M.J. (2010a) CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol*, **47**, 107-114.
- Beers, S.A., Chan, C.H., James, S., French, R.R., Attfield, K.E., Brennan, C.M., Ahuja, A., Shlomchik, M.J., Cragg, M.S. & Glennie, M.J. (2008) Type II

- (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody out performs type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood*, **112**, 4170-4177.
- Beers, S.A., French, R.R., Chan, H.T., Lim, S.H., Jarrett, T.C., Vidal, R.M., Wijayaweera, S.S., Dixon, S.V., Kim, H., Cox, K.L., Kerr, J.P., Johnston, D.A., Johnson, P.W., Verbeek, J.S., Glennie, M.J. & Cragg, M.S. (2010b) Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood*, **115**, 5191-5201.
- Bernard, M., Gressin, R., Lefrere, F., Drenou, B., Branger, B., Caulet-Maugendre, S., Tass, P., Brousse, N., Valensi, F., Milpied, N., Voilat, L., Sadoun, A., Ghandour, C., Hunault, M., Leloup, R., Mannone, L., Hermine, O. & Lamy, T. (2001) Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **15**, 1785-1791.
- Bernard, M., Tsang, R.W., Le, L.W., Hodgson, D.C., Sun, A., Wells, W., Kukreti, V., Kuruvilla, J., Crump, M. & Gospodarowicz, M.K. (2013) Limited-stage mantle cell lymphoma: treatment outcomes at the Princess Margaret Hospital. *Leukemia & lymphoma*, **54**, 261-267.
- Bernstein, S.H., Epner, E., Unger, J.M., Leblanc, M., Cebula, E., Burack, R., Rimsza, L., Miller, T.P. & Fisher, R.I. (2013) A phase II multicenter trial of hyperCVAD MTX/Ara-C and rituximab in patients with previously untreated mantle cell lymphoma; SWOG 0213. *Ann Oncol*, **24**, 1587-1593.
- Bertoni, F., Conconi, A., Cogliatti, S.B., Schmitz, S.F., Ghielmini, M., Cerny, T., Fey, M., Pichert, G., Bertolini, F., Ponzoni, M., Baldini, L., Jones, C., Auer, R., Zucca, E., Cavalli, F., Cotter, F.E. & Swiss Group for Clinical Cancer, R. (2004a) Immunoglobulin heavy chain genes somatic hypermutations and chromosome 11q22-23 deletion in classic mantle cell lymphoma: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research. *Br J Haematol*, **124**, 289-298.
- Bertoni, F., Zucca, E. & Cavalli, F. (2004b) Mantle cell lymphoma. *Curr Opin Hematol*, **11**, 411-418.
- Bodrug, S.E., Warner, B.J., Bath, M.L., Lindeman, G.J., Harris, A.W. & Adams, J.M. (1994) Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J*, **13**, 2124-2130.
- Bosch, F., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., Ribera, J.M., Conde, E., Piris, M.A., Vallespi, T., Woessner, S. & Montserrat, E. (1998) Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer*, **82**, 567-575.

- Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Walewska, R., Brown, D., Dyer, M.J. & Cain, K. (2009) Protein profiling of plasma membranes defines aberrant signaling pathways in mantle cell lymphoma. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **8**, 1501-1515.
- Boye, J., Elter, T. & Engert, A. (2003) An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann Oncol*, **14**, 520-535.
- Brepoels, L., Stroobants, S., De Wever, W., Dierickx, D., Vandenberghe, P., Thomas, J., Mortelmans, L., Verhoef, G. & De Wolf-Peeters, C. (2008) Positron emission tomography in mantle cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*, **49**, 1693-1701.
- Camacho, F.I., Algara, P., Rodriguez, A., Ruiz-Ballesteros, E., Mollejo, M., Martinez, N., Martinez-Climent, J.A., Gonzalez, M., Mateo, M., Caleo, A., Sanchez-Beato, M., Menarguez, J., Garcia-Conde, J., Sole, F., Campo, E. & Piris, M.A. (2003) Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood*, **101**, 4042-4046.
- Campo, E., Raffeld, M. & Jaffe, E.S. (1999) Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol*, **36**, 115-127.
- Campo, E., Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H. & Jaffe, E.S. (2011) The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, **117**, 5019-5032.
- Carbone, P.P., Kaplan, H.S., Musshoff, K., Smithers, D.W. & Tubiana, M. (1971) Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer research*, **31**, 1860-1861.
- Cartron, G., de Guibert, S., Dilhuydy, M.S., Morschhauser, F., Leblond, V., Dupuis, J., Mahe, B., Bouabdallah, R., Lei, G., Wenger, M., Wassner-Fritsch, E. & Hallek, M. (2014) Obinutuzumab (GA101) in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: final data from the phase 1/2 GAUGUIN study. *Blood*.
- Cecconi, D., Zamo, A., Bianchi, E., Parisi, A., Barbi, S., Milli, A., Rinalducci, S., Rosenwald, A., Hartmann, E., Zolla, L. & Chilosì, M. (2008) Signal transduction pathways of mantle cell lymphoma: a phosphoproteome-based study. *Proteomics*, **8**, 4495-4506.
- Chan, H.T., Hughes, D., French, R.R., Tutt, A.L., Walshe, C.A., Teeling, J.L., Glennie, M.J. & Cragg, M.S. (2003) CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer research*, **63**, 5480-5489.
- Chen, L., Wang, S., Zhou, Y., Wu, X., Entin, I., Epstein, J., Yaccoby, S., Xiong, W., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., Jr. & Zhan, F. (2010) Identification of early

growth response protein 1 (EGR-1) as a novel target for JUN-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood*, **115**, 61-70.

Cheson, B.D., Pfistner, B., Juweid, M.E., Gascoyne, R.D., Specht, L., Horning, S.J., Coiffier, B., Fisher, R.I., Hagenbeek, A., Zucca, E., Rosen, S.T., Stroobants, S., Lister, T.A., Hoppe, R.T., Dreyling, M., Tobinai, K., Vose, J.M., Connors, J.M., Federico, M., Diehl, V. & International Harmonization Project on, L. (2007) Revised response criteria for malignant lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **25**, 579-586.

Cittera, E., Leidi, M., Buracchi, C., Pasqualini, F., Sozzani, S., Vecchi, A., Waterfield, J.D., Introna, M. & Golay, J. (2007) The CCL3 family of chemokines and innate immunity cooperate in vivo in the eradication of an established lymphoma xenograft by rituximab. *Journal of immunology*, **178**, 6616-6623.

Cortelazzo, S., Ponzoni, M., Ferreri, A.J. & Dreyling, M. (2012) Mantle cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, **82**, 78-101.

Cragg, M.S. (2011) CD20 antibodies: doing the time warp. *Blood*, **118**, 219-220.

Cragg, M.S. & Glennie, M.J. (2004) Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood*, **103**, 2738-2743.

Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W., French, R.R. & Glennie, M.J. (2003) Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood*, **101**, 1045-1052.

Cragg, M.S., Walshe, C.A., Ivanov, A.O. & Glennie, M.J. (2005) The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*, **8**, 140-174.

Dal Col, J., Zancai, P., Terrin, L., Guidoboni, M., Ponzoni, M., Pavan, A., Spina, M., Bergamin, S., Rizzo, S., Tirelli, U., De Rossi, A., Doglioni, C. & Dolcetti, R. (2008) Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood*, **111**, 5142-5151.

de Jong, D., Rosenwald, A., Chhanabhai, M., Gaulard, P., Klapper, W., Lee, A., Sander, B., Thorns, C., Campo, E., Molina, T., Norton, A., Hagenbeek, A., Horning, S., Lister, A., Raemaekers, J., Gascoyne, R.D., Salles, G., Weller, E. & Lunenburg Lymphoma Biomarker, C. (2007) Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications--a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **25**, 805-812.

Decaudin, D., Bosq, J., Munck, J.N., Bayle, C., Koscielny, S., Boudjemaa, S., Bennaceur, A., Venuat, A.M., Naccache, P., Bendahmane, B., Ribrag, V.,

- Carde, P., Pico, J.L. & Hayat, M. (1997) Mantle cell lymphomas: characteristics, natural history and prognostic factors of 45 cases. *Leukemia & lymphoma*, **26**, 539-550.
- Drexler, H.G. (2000) *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book*. Academic Press.
- Dreyling, M. & Hiddemann, W. (2009) Current treatment standards and emerging strategies in mantle cell lymphoma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, vol. **2009** no. **1**, 542-551.
- Dreyling, M., Lenz, G., Hoster, E., Van Hoof, A., Gisselbrecht, C., Schmits, R., Metzner, B., Truemper, L., Reiser, M., Steinhauer, H., Boiron, J.M., Boogaerts, M.A., Aldaoud, A., Silingardi, V., Kluin-Nelemans, H.C., Hasford, J., Parwaresch, R., Unterhalt, M. & Hiddemann, W. (2005) Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood*, **105**, 2677-2684.
- Dyer, M.J., Fischer, P., Nacheva, E., Labastide, W. & Karpas, A. (1990) A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t(14;18) and t(4;11) chromosomal translocations. *Blood*, **75**, 709-714.
- Einfeld, D.A., Brown, J.P., Valentine, M.A., Clark, E.A. & Ledbetter, J.A. (1988) Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J*, **7**, 711-717.
- Ek, S., Dictor, M., Jerkeman, M., Jirstrom, K. & Borrebaeck, C.A. (2008) Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood*, **111**, 800-805.
- Estrov, Z., Talpaz, M., Ku, S., Harris, D., Van, Q., Beran, M., Hirsch-Ginsberg, C., Huh, Y., Yee, G. & Kurzrock, R. (1998) Z-138: a new mature B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line from a patient with transformed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, **22**, 341-353.
- Fenske, T.S., Zhang, M.J., Carreras, J., Ayala, E., Burns, L.J., Cashen, A., Costa, L.J., Freytes, C.O., Gale, R.P., Hamadani, M., Holmberg, L.A., Inwards, D.J., Lazarus, H.M., Maziarz, R.T., Munker, R., Perales, M.A., Rizzieri, D.A., Schouten, H.C., Smith, S.M., Waller, E.K., Wirk, B.M., Laport, G.G., Maloney, D.G., Montoto, S. & Hari, P.N. (2014) Autologous or reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for chemotherapy-sensitive mantle-cell lymphoma: analysis of transplantation timing and modality. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **32**, 273-281.

- Fernandez, V., Hartmann, E., Ott, G., Campo, E. & Rosenwald, A. (2005) Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **23**, 6364-6369.
- Fernandez, V., Salameró, O., Espinet, B., Sole, F., Royo, C., Navarro, A., Camacho, F., Bea, S., Hartmann, E., Amador, V., Hernandez, L., Agostinelli, C., Sargent, R.L., Rozman, M., Aymerich, M., Colomer, D., Villamor, N., Swerdlow, S.H., Pileri, S.A., Bosch, F., Piris, M.A., Montserrat, E., Ott, G., Rosenwald, A., Lopez-Guillermo, A., Jares, P., Serrano, S. & Campo, E. (2010) Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer research*, **70**, 1408-1418.
- Ferrer, A., Bosch, F., Villamor, N., Rozman, M., Graus, F., Gutierrez, G., Mercadal, S., Campo, E., Rozman, C., Lopez-Guillermo, A. & Montserrat, E. (2008) Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol*, **19**, 135-141.
- Flinn, I.W., van der Jagt, R., Kahl, B.S., Wood, P., Hawkins, T.E., Macdonald, D., Hertzberg, M., Kwan, Y.L., Simpson, D., Craig, M., Kolibaba, K., Issa, S., Clementi, R., Hallman, D.M., Munteanu, M., Chen, L. & Burke, J.M. (2014) Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study. *Blood*, **123**, 2944-2952.
- Franke, A., Niederfellner, G.J., Klein, C. & Burtscher, H. (2011) Antibodies against CD20 or B-cell receptor induce similar transcription patterns in human lymphoma cell lines. *PloS one*, **6**, e16596.
- Friedberg, J.W., Vose, J.M., Kelly, J.L., Young, F., Bernstein, S.H., Peterson, D., Rich, L., Blumel, S., Proia, N.K., Liesveld, J., Fisher, R.I., Armitage, J.O., Grant, S. & Leonard, J.P. (2011) The combination of bendamustine, bortezomib, and rituximab for patients with relapsed/refractory indolent and mantle cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, **117**, 2807-2812.
- Fu, K., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Dave, S., Wright, G., Rosenwald, A., Chiorazzi, M., Iqbal, J., Gesk, S., Siebert, R., De Jong, D., Jaffe, E.S., Wilson, W.H., Delabie, J., Ott, G., Dave, B.J., Sanger, W.G., Smith, L.M., Rimsza, L., Braziel, R.M., Muller-Hermelink, H.K., Campo, E., Gascoyne, R.D., Staudt, L.M., Chan, W.C. & Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling, P. (2005) Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*, **106**, 4315-4321.
- Gao, J., Peterson, L., Nelson, B., Goolsby, C. & Chen, Y.H. (2009) Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*, **132**, 699-706.

- Ge, X. & Wang, X. (2010) Role of Wnt canonical pathway in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*, **3**, 33.
- Gelebart, P., Anand, M., Armanious, H., Peters, A.C., Dien Bard, J., Amin, H.M. & Lai, R. (2008) Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood*, **112**, 5171-5179.
- Gibbs, J.D., Liebermann, D.A. & Hoffman, B. (2008a) Egr-1 abrogates the E2F-1 block in terminal myeloid differentiation and suppresses leukemia. *Oncogene*, **27**, 98-106.
- Gibbs, J.D., Liebermann, D.A. & Hoffman, B. (2008b) Leukemia suppressor function of Egr-1 is dependent on transforming oncogene. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **22**, 1909-1916.
- Giles, F.J., Vose, J.M., Do, K.A., Johnson, M.M., Manshouri, T., Bociek, G., Bierman, P.J., O'Brien, S.M., Keating, M.J., Kantarjian, H.M., Armitage, J.O. & Albitar, M. (2003) Circulating CD20 and CD52 in patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's disease. *Br J Haematol*, **123**, 850-857.
- Gill, S., Wolf, M., Prince, H.M., Januszewicz, H., Ritchie, D., Hicks, R.J. & Seymour, J.F. (2008) [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography scanning for staging, response assessment, and disease surveillance in patients with mantle cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma*, **8**, 159-165.
- Glennie, M.J., French, R.R., Cragg, M.S. & Taylor, R.P. (2007) Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Molecular immunology*, **44**, 3823-3837.
- Goy, A., Bernstein, S.H., Kahl, B.S., Djulbegovic, B., Robertson, M.J., de Vos, S., Epner, E., Krishnan, A., Leonard, J.P., Lonial, S., Nasta, S., O'Connor, O.A., Shi, H., Boral, A.L. & Fisher, R.I. (2009) Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann Oncol*, **20**, 520-525.
- Goy, A., Sinha, R., Williams, M.E., Kalayoglu Basisik, S., Drach, J., Ramchandren, R., Zhang, L., Cicero, S., Fu, T. & Witzig, T.E. (2013) Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **31**, 3688-3695.
- Greiner, T.C., Dasgupta, C., Ho, V.V., Weisenburger, D.D., Smith, L.M., Lynch, J.C., Vose, J.M., Fu, K., Armitage, J.O., Brazier, R.M., Campo, E., Delabie, J., Gascoyne, R.D., Jaffe, E.S., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Im, M.Y., Karaman, M.W., Pike, B.L., Chan, W.C. & Hacia, J.G. (2006) Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated

- (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2352-2357.
- Greiner, T.C., Moynihan, M.J., Chan, W.C., Lytle, D.M., Pedersen, A., Anderson, J.R. & Weisenburger, D.D. (1996) p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood*, **87**, 4302-4310.
- Griffiths, R., Mikhael, J., Gleeson, M., Danese, M. & Dreyling, M. (2011) Addition of rituximab to chemotherapy alone as first-line therapy improves overall survival in elderly patients with mantle cell lymphoma. *Blood*, **118**, 4808-4816.
- Gualco, G., Weiss, L.M., Harrington, W.J., Jr. & Bacchi, C.E. (2010) BCL6, MUM1, and CD10 expression in mantle cell lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, **18**, 103-108.
- Harbour, J.W. & Dean, D.C. (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, **14**, 2393-2409.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C. & et al. (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, **84**, 1361-1392.
- Heinrich, D.A., Weinkauff, M., Hutter, G., Zimmermann, Y., Jurinovic, V., Hiddemann, W. & Dreyling, M. (2015) Differential regulation patterns of the anti-CD20 antibodies obinutuzumab and rituximab in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*, **168**, 606-610.
- Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., Hanushevsky, O., Clancy, J., Hewes, B., Moore, L. & Coiffier, B. (2009) Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 3822-3829.
- Honeychurch, J., Alduaij, W., Azizyan, M., Cheadle, E.J., Pelicano, H., Ivanov, A., Huang, P., Cragg, M.S. & Illidge, T.M. (2012) Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood*, **119**, 3523-3533.
- Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., van Hoof, A., Kluin-Nelemans, H.C., Pfreundschuh, M., Reiser, M., Metzner, B., Einsele, H., Peter, N., Jung, W., Wormann, B., Ludwig, W.D., Duhrsen, U., Eimermacher, H., Wandt, H., Hasford, J., Hiddemann, W., Unterhalt, M., German Low Grade Lymphoma Study, G. & European Mantle Cell Lymphoma, N. (2008) A new

- prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*, **111**, 558-565.
- Hoster, E., Klapper, W., Hermine, O., Kluin-Nelemans, H.C., Walewski, J., van Hoof, A., Trneny, M., Geisler, C.H., Di Raimondo, F., Szymczyk, M., Stilgenbauer, S., Thieblemont, C., Hallek, M., Forstpointner, R., Pott, C., Ribrag, V., Doorduijn, J., Hiddemann, W., Dreyling, M.H. & Unterhalt, M. (2014) Confirmation of the mantle-cell lymphoma International Prognostic Index in randomized trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **32**, 1338-1346.
- Ivanov, A., Beers, S.A., Walshe, C.A., Honeychurch, J., Alduaij, W., Cox, K.L., Potter, K.N., Murray, S., Chan, C.H., Klymenko, T., Erenpreisa, J., Glennie, M.J., Illidge, T.M. & Cragg, M.S. (2009) Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest*, **119**, 2143-2159.
- Ivanov, A., Krysov, S., Cragg, M.S. & Illidge, T. (2008) Radiation therapy with tositumomab (B1) anti-CD20 monoclonal antibody initiates extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-dependent cell death that overcomes resistance to apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **14**, 4925-4934.
- Jak, M., van Bochove, G.G., Reits, E.A., Kallemeijn, W.W., Tromp, J.M., Umana, P., Klein, C., van Lier, R.A., van Oers, M.H. & Eldering, E. (2011) CD40 stimulation sensitizes CLL cells to lysosomal cell death induction by type II anti-CD20 mAb GA101. *Blood*, **118**, 5178-5188.
- Jeon, H.J., Kim, C.W., Yoshino, T. & Akagi, T. (1998) Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *Br J Haematol*, **102**, 1323-1326.
- Jia, L., Yu, W., Wang, P., Li, J., Sanders, B.G. & Kline, K. (2008) Critical roles for JNK, c-Jun, and Fas/FasL-Signaling in vitamin E analog-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Prostate*, **68**, 427-441.
- Jiang, W., Kahn, S.M., Zhou, P., Zhang, Y.J., Cacace, A.M., Infante, A.S., Doi, S., Santella, R.M. & Weinstein, I.B. (1993) Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene*, **8**, 3447-3457.
- Kahl, B.S., Spurgeon, S.E., Furman, R.R., Flinn, I.W., Coutre, S.E., Brown, J.R., Benson, D.M., Byrd, J.C., Peterman, S., Cho, Y., Yu, A., Godfrey, W.R. & Wagner-Johnston, N.D. (2014) A phase 1 study of the PI3Kdelta inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL). *Blood*, **123**, 3398-3405.

- Karnofsky DA, B.J. (1949) The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: *Evaluation of chemotherapeutic agents* (ed. by CM, M.), pp. 191–205. Columbia University Press, New York.
- Katzenberger, T., Petzoldt, C., Holler, S., Mader, U., Kalla, J., Adam, P., Ott, M.M., Muller-Hermelink, H.K., Rosenwald, A. & Ott, G. (2006) The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood*, **107**, 3407.
- Kaufmann, K., Bach, K. & Thiel, G. (2001) The extracellular signal-regulated protein kinases Erk1/Erk2 stimulate expression and biological activity of the transcriptional regulator Egr-1. *Biol Chem*, **382**, 1077-1081.
- Kaufmann, K. & Thiel, G. (2002) Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *J Cell Biochem*, **85**, 381-391.
- Kienle, D., Krober, A., Katzenberger, T., Ott, G., Leupolt, E., Barth, T.F., Moller, P., Benner, A., Habermann, A., Muller-Hermelink, H.K., Bentz, M., Lichter, P., Dohner, H. & Stilgenbauer, S. (2003) VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, **102**, 3003-3009.
- Klapper, W., Hoster, E., Determann, O., Oschlies, I., van der Laak, J., Berger, F., Bernd, H.W., Cabecadas, J., Campo, E., Cogliatti, S., Hansmann, M.L., Kluin, P.M., Kodet, R., Krivolapov, Y.A., Loddenkemper, C., Stein, H., Moller, P., Barth, T.E., Muller-Hermelink, K., Rosenwald, A., Ott, G., Pileri, S., Ralfkiaer, E., Rymkiewicz, G., van Krieken, J.H., Wacker, H.H., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Dreyling, M. & European, M.C.L.N. (2009) Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop*, **2**, 103-111.
- Klein, C., Lammens, A., Schafer, W., Georges, G., Schwaiger, M., Mossner, E., Hopfner, K.P., Umana, P. & Niederfellner, G. (2013) Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs*, **5**, 22-33.
- Kluin-Nelemans, H.C., Hoster, E., Hermine, O., Walewski, J., Trneny, M., Geisler, C.H., Stilgenbauer, S., Thieblemont, C., Vehling-Kaiser, U., Doorduijn, J.K., Coiffier, B., Forstpointner, R., Tilly, H., Kanz, L., Feugier, P., Szymczyk, M., Hallek, M., Kremers, S., Lepeu, G., Sanhes, L., Zijlstra, J.M., Bouabdallah, R., Lugtenburg, P.J., Macro, M., Pfreundschuh, M., Prochazka, V., Di Raimondo, F., Ribrag, V., Uppenkamp, M., Andre, M., Klapper, W., Hiddemann, W., Unterhalt, M. & Dreyling, M.H. (2012) Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*, **367**, 520-531.
- Kohler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.

- Kohlmann, A., Schoch, C., Schnittger, S., Dugas, M., Hiddemann, W., Kern, W. & Haferlach, T. (2003) Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology. *Genes Chromosomes Cancer*, **37**, 396-405.
- Kroemer, G. & Jaattela, M. (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer*, **5**, 886-897.
- LaCasce, A.S., Vandergrift, J.L., Rodriguez, M.A., Abel, G.A., Crosby, A.L., Czuczman, M.S., Nademanee, A.P., Blayney, D.W., Gordon, L.I., Millenson, M., Vanderplas, A., Lepisto, E.M., Zelenetz, A.D., Niland, J. & Friedberg, J.W. (2012) Comparative outcome of initial therapy for younger patients with mantle cell lymphoma: an analysis from the NCCN NHL Database. *Blood*, **119**, 2093-2099.
- Lannutti, B.J., Meadows, S.A., Herman, S.E., Kashishian, A., Steiner, B., Johnson, A.J., Byrd, J.C., Tyner, J.W., Loriaux, M.M., Deininger, M., Druker, B.J., Puri, K.D., Ulrich, R.G. & Giese, N.A. (2011) CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*, **117**, 591-594.
- Lardelli, P., Bookman, M.A., Sundeen, J., Longo, D.L. & Jaffe, E.S. (1990) Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation. Morphologic and immunophenotypic spectrum and clinical correlations. *Am J Surg Pathol*, **14**, 752-763.
- Laszlo, T. & Matolcsy, A. (1999) Blastic transformation of mantle cell lymphoma: genetic evidence for a clonal link between the two stages of the tumour. *Histopathology*, **35**, 355-359.
- Lee, H.Z., Miller, B.W., Kwitkowski, V.E., Ricci, S., DelValle, P., Saber, H., Grillo, J., Bullock, J., Florian, J., Mehrotra, N., Ko, C.W., Nie, L., Shapiro, M., Tolnay, M., Kane, R.C., Kaminskas, E., Justice, R., Farrell, A.T. & Pazdur, R. (2014) U.s. Food and drug administration approval: obinutuzumab in combination with chlorambucil for the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **20**, 3902-3907.
- Leitch, H.A., Gascoyne, R.D., Chhanabhai, M., Voss, N.J., Klasa, R. & Connors, J.M. (2003) Limited-stage mantle-cell lymphoma. *Ann Oncol*, **14**, 1555-1561.
- Lennert, K., Stein, H. & Kaiserling, E. (1975) Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer Suppl*, **2**, 29-43.
- Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wormann, B., Duhrsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., Martin, S., Heidemann, E., Aldaoud, A., Parwaresch, R., Hasford, J., Unterhalt, M. & Hiddemann, W. (2005) Immunochemotherapy with rituximab and

- cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **23**, 1984-1992.
- Lenz, G. & Staudt, L.M. (2010) Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*, **362**, 1417-1429.
- Liang, W., Zhang, W.J., Gao, Q.M., Lu, H.N., Huang, B.B., Xiu, B. & Liang, A.B. (2012) [Silencing of survivin gene in jeko-1 cell line with small interfering RNA]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, **20**, 88-92.
- Lim, S.H., Beers, S.A., French, R.R., Johnson, P.W., Glennie, M.J. & Cragg, M.S. (2010) Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*, **95**, 135-143.
- Lima, R.T., Busacca, S., Almeida, G.M., Gaudino, G., Fennell, D.A. & Vasconcelos, M.H. (2011) MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. *European journal of cancer*, **47**, 163-174.
- Liu, C., Rangnekar, V.M., Adamson, E. & Mercola, D. (1998) Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Ther*, **5**, 3-28.
- Majlis, A., Pugh, W.C., Rodriguez, M.A., Benedict, W.F. & Cabanillas, F. (1997) Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **15**, 1664-1671.
- Maloney, D.G. (2012) Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, **366**, 2008-2016.
- Maloney, D.G., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., Bodkin, D., Schilder, R.J., Neidhart, J.A., Janakiraman, N., Foon, K.A., Liles, T.M., Dallaire, B.K., Wey, K., Royston, I., Davis, T. & Levy, R. (1997) IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **90**, 2188-2195.
- Manshouri, T., Do, K.A., Wang, X., Giles, F.J., O'Brien, S.M., Saffer, H., Thomas, D., Jilani, I., Kantarjian, H.M., Keating, M.J. & Albitar, M. (2003) Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood*, **101**, 2507-2513.
- Martin, P., Chadburn, A., Christos, P., Weil, K., Furman, R.R., Ruan, J., Elstrom, R., Niesvizky, R., Ely, S., Diliberto, M., Melnick, A., Knowles, D.M., Chen-Kiang,

- S., Coleman, M. & Leonard, J.P. (2009) Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 1209-1213.
- Martinez, N., Camacho, F.I., Algara, P., Rodriguez, A., Dopazo, A., Ruiz-Ballesteros, E., Martin, P., Martinez-Climent, J.A., Garcia-Conde, J., Menarguez, J., Solano, F., Mollejo, M. & Piris, M.A. (2003) The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. *Cancer research*, **63**, 8226-8232.
- Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. & Kato, J.Y. (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, **14**, 2066-2076.
- Menendez, P., Vargas, A., Bueno, C., Barrena, S., Almeida, J., De Santiago, M., Lopez, A., Roa, S., San Miguel, J.F. & Orfao, A. (2004) Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **18**, 491-498.
- Meyerson, M. & Harlow, E. (1994) Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Molecular and cellular biology*, **14**, 2077-2086.
- Mitnacht, S., Lees, J.A., Desai, D., Harlow, E., Morgan, D.O. & Weinberg, R.A. (1994) Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation. *EMBO J*, **13**, 118-127.
- Morschhauser, F.A., Cartron, G., Thieblemont, C., Solal-Celigny, P., Haioun, C., Bouabdallah, R., Feugier, P., Bouabdallah, K., Asikanius, E., Lei, G., Wenger, M., Wassner-Fritsch, E. & Salles, G.A. (2013) Obinutuzumab (GA101) monotherapy in relapsed/refractory diffuse large b-cell lymphoma or mantle-cell lymphoma: results from the phase II GAUGUIN study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **31**, 2912-2919.
- Morton, L.M., Wang, S.S., Devesa, S.S., Hartge, P., Weisenburger, D.D. & Linet, M.S. (2006) Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*, **107**, 265-276.
- Mossner, E., Brunker, P., Moser, S., Puntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., Ferrara, C., Sondermann, P., Jager, C., Strein, P., Fertig, G., Friess, T., Schull, C., Bauer, S., Dal Porto, J., Del Nagro, C., Dabbagh, K., Dyer, M.J., Poppema, S., Klein, C. & Umana, P. (2010) Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*, **115**, 4393-4402.

- Motokura, T., Bloom, T., Kim, H.G., Juppner, H., Ruderman, J.V., Kronenberg, H.M. & Arnold, A. (1991) A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*, **350**, 512-515.
- Mozos, A., Royo, C., Hartmann, E., De Jong, D., Baro, C., Valera, A., Fu, K., Weisenburger, D.D., Delabie, J., Chuang, S.S., Jaffe, E.S., Ruiz-Marcellan, C., Dave, S., Rimsza, L., Braziel, R., Gascoyne, R.D., Sole, F., Lopez-Guillermo, A., Colomer, D., Staudt, L.M., Rosenwald, A., Ott, G., Jares, P. & Campo, E. (2009) SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*, **94**, 1555-1562.
- Muller, A.M., Ihorst, G., Mertelsmann, R. & Engelhardt, M. (2005) Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol*, **84**, 1-12.
- Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G.J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Slootstra, J.W., Timmerman, P., Brannstrom, A., Lindstrom, F., Mossner, E., Umana, P., Hopfner, K.P. & Klein, C. (2011) Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood*, **118**, 358-367.
- Niwa, R., Hatanaka, S., Shoji-Hosaka, E., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Yokoi, H., Nakamura, K. & Shitara, K. (2004) Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of FcγRIIIa functional polymorphism. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **10**, 6248-6255.
- Ogura, M., Tobinai, K., Hatake, K., Uchida, T., Suzuki, T., Kobayashi, Y., Mori, M., Terui, Y., Yokoyama, M. & Hotta, T. (2013) Phase I study of obinutuzumab (GA101) in Japanese patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci*, **104**, 105-110.
- Orchard, J., Garand, R., Davis, Z., Babbage, G., Sahota, S., Matutes, E., Catovsky, D., Thomas, P.W., Avet-Loiseau, H. & Oscier, D. (2003) A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*, **101**, 4975-4981.
- Ortega-Paino, E., Fransson, J., Ek, S. & Borrebaeck, C.A. (2008) Functionally associated targets in mantle cell lymphoma as defined by DNA microarrays and RNA interference. *Blood*, **111**, 1617-1624.
- Ott, G., Kalla, J., Hanke, A., Muller, J.G., Rosenwald, A., Katzenberger, T., Kretschmar, R., Kreipe, H. & Muller-Hermelink, H.K. (1998) The cytomorphological spectrum of mantle cell lymphoma is reflected by distinct biological features. *Leukemia & lymphoma*, **32**, 55-63.

- Ott, G., Kalla, J., Ott, M.M., Schryen, B., Katzenberger, T., Muller, J.G. & Muller-Hermelink, H.K. (1997) Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood*, **89**, 1421-1429.
- Parekh, S., Weniger, M.A. & Wiestner, A. (2011) New molecular targets in mantle cell lymphoma. *Seminars in cancer biology*, **21**, 335-346.
- Perez-Galan, P., Dreyling, M. & Wiestner, A. (2011) Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*, **117**, 26-38.
- Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., Lo, P. & Ford, R.J. (2003) Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of immunology*, **171**, 88-95.
- Pinyol, M., Cobo, F., Bea, S., Jares, P., Nayach, I., Fernandez, P.L., Montserrat, E., Cardesa, A. & Campo, E. (1998) p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, **91**, 2977-2984.
- Pinyol, M., Hernandez, L., Cazorla, M., Balbin, M., Jares, P., Fernandez, P.L., Montserrat, E., Cardesa, A., Lopez-Otin, C. & Campo, E. (1997) Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*, **89**, 272-280.
- Pittaluga, S., Verhoef, G., Criel, A., Wlodarska, I., Dierlamm, J., Mecucci, C., Van den Berghe, H. & De Wolf-Peeters, C. (1996) "Small" B-cell non-Hodgkin's lymphomas with splenomegaly at presentation are either mantle cell lymphoma or marginal zone cell lymphoma. A study based on histology, cytology, immunohistochemistry, and cytogenetic analysis. *Am J Surg Pathol*, **20**, 211-223.
- Pittaluga, S., Wlodarska, I., Stul, M.S., Thomas, J., Verhoef, G., Cassiman, J.J., Van den Berghe, H. & de Wolf-Peeters, C. (1995) Mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 55 cases. *Histopathology*, **26**, 17-24.
- Podar, K., Raab, M.S., Tonon, G., Sattler, M., Barila, D., Zhang, J., Tai, Y.T., Yasui, H., Raje, N., DePinho, R.A., Hideshima, T., Chauhan, D. & Anderson, K.C. (2007) Up-regulation of c-Jun inhibits proliferation and induces apoptosis via caspase-triggered c-Abl cleavage in human multiple myeloma. *Cancer research*, **67**, 1680-1688.
- Quintanilla-Martinez, L., Davies-Hill, T., Fend, F., Calzada-Wack, J., Sorbara, L., Campo, E., Jaffe, E.S. & Raffeld, M. (2003) Sequestration of p27Kip1 protein

by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. *Blood*, **101**, 3181-3187.

Radford, J., Davies, A., Cartron, G., Morschhauser, F., Salles, G., Marcus, R., Wenger, M., Lei, G., Wassner-Fritsch, E. & Vitolo, U. (2013) Obinutuzumab (GA101) plus CHOP or FC in relapsed/refractory follicular lymphoma: results of the GAUDI study (BO21000). *Blood*, **122**, 1137-1143.

Raffeld, M. & Jaffe, E.S. (1991) bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood*, **78**, 259-263.

Rahal, R., Frick, M., Romero, R., Korn, J.M., Kridel, R., Chan, F.C., Meissner, B., Bhang, H.E., Ruddy, D., Kauffmann, A., Farsidjani, A., Derti, A., Rakiec, D., Naylor, T., Pfister, E., Kovats, S., Kim, S., Dietze, K., Dorken, B., Steidl, C., Tzankov, A., Hummel, M., Monahan, J., Morrissey, M.P., Fritsch, C., Sellers, W.R., Cooke, V.G., Gascoyne, R.D., Lenz, G. & Stegmeier, F. (2014) Pharmacological and genomic profiling identifies NF-kappaB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat Med*, **20**, 87-92.

Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N. & Anderson, D.R. (1994) Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, **83**, 435-445.

Rimokh, R., Berger, F., Delsol, G., Digonnet, I., Rouault, J.P., Tigaud, J.D., Gadoux, M., Coiffier, B., Bryon, P.A. & Magaud, J.P. (1994) Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood*, **83**, 1871-1875.

Rinaldi, A., Kwee, I., Tadorelli, M., Largo, C., Uccella, S., Martin, V., Poretti, G., Gaidano, G., Calabrese, G., Martinelli, G., Baldini, L., Pruneri, G., Capella, C., Zucca, E., Cotter, F.E., Cigudosa, J.C., Catapano, C.V., Tibiletti, M.G. & Bertoni, F. (2006) Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *British journal of haematology*, **132**, 303-316.

Rizzatti, E.G., Falcao, R.P., Panepucci, R.A., Proto-Siqueira, R., Anselmo-Lima, W.T., Okamoto, O.K. & Zago, M.A. (2005) Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways. *Br J Haematol*, **130**, 516-526.

Roche Fachinformation - Rituximab URL: http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000165/WC500025821.pdf.

Romaguera, J.E., Fayad, L., Rodriguez, M.A., Broglio, K.R., Hagemeister, F.B., Pro, B., McLaughlin, P., Younes, A., Samaniego, F., Goy, A., Sarris, A.H., Dang,

- N.H., Wang, M., Beasley, V., Medeiros, L.J., Katz, R.L., Gagneja, H., Samuels, B.I., Smith, T.L. & Cabanillas, F.F. (2005) High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **23**, 7013-7023.
- Romaguera, J.E., Medeiros, L.J., Hagemeister, F.B., Fayad, L.E., Rodriguez, M.A., Pro, B., Younes, A., McLaughlin, P., Goy, A., Sarris, A.H., Dang, N.H., Samaniego, F., Brown, H.M., Gagneja, H.K. & Cabanillas, F. (2003) Frequency of gastrointestinal involvement and its clinical significance in mantle cell lymphoma. *Cancer*, **97**, 586-591.
- Rosenberg, C.L., Wong, E., Petty, E.M., Bale, A.E., Tsujimoto, Y., Harris, N.L. & Arnold, A. (1991) PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9638-9642.
- Rosenwald, A. (2003) DNA microarrays in lymphoid malignancies. *Oncology (Williston Park)*, **17**, 1743-1748; discussion 1750, 1755, 1758-1749 passim.
- Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Gascoyne, R.D., Grogan, T.M., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Chiorazzi, M., Giltner, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Henrikson, S., Yang, L., Powell, J., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Montserrat, E., Bosch, F., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Fisher, R.I., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J. & Staudt, L.M. (2003) The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*, **3**, 185-197.
- Rudelius, M., Pittaluga, S., Nishizuka, S., Pham, T.H., Fend, F., Jaffe, E.S., Quintanilla-Martinez, L. & Raffeld, M. (2006) Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*, **108**, 1668-1676.
- Rudolph, C., Steinemann, D., Von Neuhoff, N., Gadzicki, D., Ripperger, T., Drexler, H.G., Mrasek, K., Liehr, T., Claussen, U., Emura, M., Schrock, E. & Schlegelberger, B. (2004) Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genet Cytogenet*, **153**, 144-150.
- Rummel, M.J., Al-Batran, S.E., Kim, S.Z., Welslau, M., Hecker, R., Kofahl-Krause, D., Josten, K.M., Durk, H., Rost, A., Neise, M., von Grunhagen, U., Chow, K.U., Hansmann, M.L., Hoelzer, D. & Mitrou, P.S. (2005) Bendamustine plus rituximab is effective and has a favorable toxicity profile in the treatment of mantle cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical*

oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, **23**, 3383-3389.

Salaverria, I., Royo, C., Carvajal-Cuenca, A., Clot, G., Navarro, A., Valera, A., Song, J.Y., Woroniecka, R., Rymkiewicz, G., Klapper, W., Hartmann, E.M., Sujobert, P., Wlodarska, I., Ferry, J.A., Gaulard, P., Ott, G., Rosenwald, A., Lopez-Guillermo, A., Quintanilla-Martinez, L., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Siebert, R., Campo, E. & Bea, S. (2013) CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood*, **121**, 1394-1402.

Salaverria, I., Zettl, A., Bea, S., Moreno, V., Valls, J., Hartmann, E., Ott, G., Wright, G., Lopez-Guillermo, A., Chan, W.C., Weisenburger, D.D., Gascoyne, R.D., Grogan, T.M., Delabie, J., Jaffe, E.S., Montserrat, E., Muller-Hermelink, H.K., Staudt, L.M., Rosenwald, A. & Campo, E. (2007) Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **25**, 1216-1222.

Schollkopf, C., Melbye, M., Munksgaard, L., Smedby, K.E., Rostgaard, K., Glimelius, B., Chang, E.T., Roos, G., Hansen, M., Adami, H.O. & Hjalgrim, H. (2008) *Borrelia* infection and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, **111**, 5524-5529.

Schulz, H., Bohlius, J.F., Trelle, S., Skoetz, N., Reiser, M., Kober, T., Schwarzer, G., Herold, M., Dreyling, M., Hallek, M. & Engert, A. (2007) Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, **99**, 706-714.

Sehn, L.H., Assouline, S.E., Stewart, D.A., Mangel, J., Gascoyne, R.D., Fine, G., Frances-Lasserre, S., Carlile, D.J. & Crump, M. (2012) A phase 1 study of obinutuzumab induction followed by 2 years of maintenance in patients with relapsed CD20-positive B-cell malignancies. *Blood*, **119**, 5118-5125.

Shaulian, E. & Karin, M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20**, 2390-2400.

Shin, S., Sung, B.J., Cho, Y.S., Kim, H.J., Ha, N.C., Hwang, J.I., Chung, C.W., Jung, Y.K. & Oh, B.H. (2001) An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry*, **40**, 1117-1123.

Smith, A., Howell, D., Patmore, R., Jack, A. & Roman, E. (2011) Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*, **105**, 1684-1692.

Smith, M.R., Li, H., Gordon, L., Gascoyne, R.D., Paietta, E., Forero-Torres, A., Kahl, B.S., Advani, R., Hong, F. & Horning, S.J. (2012) Phase II study of rituximab

- plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone immunochemotherapy followed by yttrium-90-ibritumomab tiuxetan in untreated mantle-cell lymphoma: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1499. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **30**, 3119-3126.
- Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine*, **9**, 59-71.
- Stashenko, P., Nadler, L.M., Hardy, R. & Schlossman, S.F. (1980) Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *Journal of immunology*, **125**, 1678-1685.
- Stilgenbauer, S., Schaffner, C., Winkler, D., Ott, G., Leupolt, E., Bentz, M., Moller, P., Muller-Hermelink, H.K., James, M.R., Lichter, P. & Dohner, H. (2000) The ATM gene in the pathogenesis of mantle-cell lymphoma. *Ann Oncol*, **11 Suppl 1**, 127-130.
- Tam, C.S., Bassett, R., Ledesma, C., Korbling, M., Alousi, A., Hosing, C., Kebraei, P., Harrell, R., Rondon, G., Giral, S.A., Anderlini, P., Popat, U., Pro, B., Samuels, B., Hagemeister, F., Medeiros, L.J., Champlin, R.E. & Khouri, I.F. (2009) Mature results of the M. D. Anderson Cancer Center risk-adapted transplantation strategy in mantle cell lymphoma. *Blood*, **113**, 4144-4152.
- Thomas, S., Preda-Pais, A., Casares, S. & Brumeanu, T.D. (2004) Analysis of lipid rafts in T cells. *Molecular immunology*, **41**, 399-409.
- Tiemann, M., Schrader, C., Klapper, W., Dreyling, M.H., Campo, E., Norton, A., Berger, F., Kluin, P., Ott, G., Pileri, S., Pedrinis, E., Feller, A.C., Merz, H., Janssen, D., Hansmann, M.L., Krieken, H., Moller, P., Stein, H., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Parwaresch, R. & European, M.C.L.N. (2005) Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol*, **131**, 29-38.
- Tolksdorf, G., Stein, H. & Lennert, K. (1980) Morphological and immunological definition of a malignant lymphoma derived from germinal-centre cells with cleaved nuclei (centrocytes). *Br J Cancer*, **41**, 168-182.
- Tort, F., Camacho, E., Bosch, F., Harris, N.L., Montserrat, E. & Campo, E. (2004) Familial lymphoid neoplasms in patients with mantle cell lymphoma. *Haematologica*, **89**, 314-319.
- van Meerten, T. & Hagenbeek, A. (2010) CD20-targeted therapy: the next generation of antibodies. *Semin Hematol*, **47**, 199-210.

- Vegliante, M.C., Palomero, J., Perez-Galan, P., Roue, G., Castellano, G., Navarro, A., Clot, G., Moros, A., Suarez-Cisneros, H., Bea, S., Hernandez, L., Enjuanes, A., Jares, P., Villamor, N., Colomer, D., Martin-Subero, J.I., Campo, E. & Amador, V. (2013) SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. *Blood*, **121**, 2175-2185.
- Velders, G.A., Kluin-Nelemans, J.C., De Boer, C.J., Hermans, J., Noordijk, E.M., Schuuring, E., Kramer, M.H., Van Deijk, W.A., Rahder, J.B., Kluin, P.M. & Van Krieken, J.H. (1996) Mantle-cell lymphoma: a population-based clinical study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **14**, 1269-1274.
- Viatour, P., Merville, M.P., Bours, V. & Chariot, A. (2005) Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci*, **30**, 43-52.
- Viswanatha, D.S., Foucar, K., Berry, B.R., Gascoyne, R.D., Evans, H.L. & Leith, C.P. (2000) Blastic mantle cell leukemia: an unusual presentation of blastic mantle cell lymphoma. *Mod Pathol*, **13**, 825-833.
- Vogler, M. (2012) BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ*, **19**, 67-74.
- Vose, J.M. (2013) Mantle cell lymphoma: 2013 Update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am J Hematol*, **88**, 1082-1088.
- Wagner, M., Schmelz, K., Dorken, B. & Tamm, I. (2008) Transcriptional regulation of human survivin by early growth response (Egr)-1 transcription factor. *Int J Cancer*, **122**, 1278-1287.
- Walsh, S.H., Thorselius, M., Johnson, A., Soderberg, O., Jerkeman, M., Bjorck, E., Eriksson, I., Thunberg, U., Landgren, O., Ehinger, M., Lofvenberg, E., Wallman, K., Enblad, G., Sander, B., Porwit-MacDonald, A., Dictor, M., Olofsson, T., Sundstrom, C., Roos, G. & Rosenquist, R. (2003) Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood*, **101**, 4047-4054.
- Wang, M., Fayad, L., Wagner-Bartak, N., Zhang, L., Hagemeister, F., Neelapu, S.S., Samaniego, F., McLaughlin, P., Fanale, M., Younes, A., Cabanillas, F., Fowler, N., Newberry, K.J., Sun, L., Young, K.H., Champlin, R., Kwak, L., Feng, L., Badillo, M., Bejarano, M., Hartig, K., Chen, W., Chen, Y., Byrne, C., Bell, N., Zeldis, J. & Romaguera, J. (2012) Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial. *Lancet Oncol*, **13**, 716-723.

- Wang, M., Oki, Y., Pro, B., Romaguera, J.E., Rodriguez, M.A., Samaniego, F., McLaughlin, P., Hagemeister, F., Neelapu, S., Copeland, A., Samuels, B.I., Loyer, E.M., Ji, Y. & Younes, A. (2009) Phase II study of yttrium-90-ibritumomab tiuxetan in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 5213-5218.
- Wang, M.L., Rule, S., Martin, P., Goy, A., Auer, R., Kahl, B.S., Jurczak, W., Advani, R.H., Romaguera, J.E., Williams, M.E., Barrientos, J.C., Chmielewska, E., Radford, J., Stilgenbauer, S., Dreyling, M., Jedrzejczak, W.W., Johnson, P., Spurgeon, S.E., Li, L., Zhang, L., Newberry, K., Ou, Z., Cheng, N., Fang, B., McGreivy, J., Clow, F., Buggy, J.J., Chang, B.Y., Beaupre, D.M., Kunkel, L.A. & Blum, K.A. (2013) Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*, **369**, 507-516.
- Webb, J. (1963) Effect of more than one inhibitor, antagonism, summation, and synergism. *Enzyme and metabolic inhibitors, Academic Press, New York (NY)*, **1**, 488-512.
- Weiglein, T. (2012) Molekular gezielte Therapie des Mantelzelllymphoms - In Vitro Wirksamkeit von Flavopiridol
in Mono- und Kombinationstherapie. In: *Medizinische Klinik und Poliklinik III, Vol. Medicine. Ludwig-Maximilians-Universität München, München*.
- Weinkauff, M.O. (2008) Untersuchung zur Proteasomenhemmung des Mantelzelllymphoms mittels Bortezomib unter besonderer Berücksichtigung proteinanalytischer Verfahren. In: *Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum der Universität München, Vol. Humanbiologie*, p. 139. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Weisenburger, D.D. & Armitage, J.O. (1996) Mantle cell lymphoma-- an entity comes of age. *Blood*, **87**, 4483-4494.
- Weisenburger, D.D., Nathwani, B.N., Diamond, L.W., Winberg, C.D. & Rappaport, H. (1981) Malignant lymphoma, intermediate lymphocytic type: a clinicopathologic study of 42 cases. *Cancer*, **48**, 1415-1425.
- Wiestner, A., Tehrani, M., Chiorazzi, M., Wright, G., Gibellini, F., Nakayama, K., Liu, H., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Vose, J., Armitage, J.O., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Campo, E., Montserrat, E., Bosch, F., Smeland, E.B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Fisher, R.I., Grogan, T.M., Miller, T.P., Wilson, W.H., Jaffe, E.S. & Staudt, L.M. (2007) Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood*, **109**, 4599-4606.
- Williams, M.E. & Densmore, J.J. (2005) Biology and therapy of mantle cell lymphoma. *Current opinion in oncology*, **17**, 425-431.

- Wlodarska, I., Dierickx, D., Vanhentenrijk, V., Van Roosbroeck, K., Pospisilova, H., Minnei, F., Verhoef, G., Thomas, J., Vandenberghe, P. & De Wolf-Peeters, C. (2008) Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood*, **111**, 5683-5690.
- Yin, Y., Liu, Y.X., Jin, Y.J., Hall, E.J. & Barrett, J.C. (2003) PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature*, **422**, 527-531.
- Zhou, Y., Wang, H., Fang, W., Romaguer, J.E., Zhang, Y., Delasalle, K.B., Kwak, L., Yi, Q., Du, X.L. & Wang, M. (2008) Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer*, **113**, 791-798.
- Zucca, E., Stein, H. & Coiffier, B. (1994) European Lymphoma Task Force (ELTF): Report of the workshop on Mantle Cell Lymphoma (MCL). *Ann Oncol*, **5**, 507-511.

9 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity, Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis, Phagozytose
AID	activation-induced cytidine deaminase
AKT	Proteinkinase B
AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2
ANXA1	annexin A1
ASCT	autologe Stammzelltransplantation
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
B-CLL	chronisch lymphatischen Leukämie
B-NHL	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
BCL-2	B cell lymphoma 2
BCL1	breakage cluster of lymphoma 1
BCL2A1	BCL2-related protein A1
BTK	Bruton-Kinase
BZR	B-Zell-Rezeptor
C16orf54	chromosome 16 open reading frame 54
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4
CCND1	Cyclin D1
CCND2	Cyclin D2
CCND3	Cyclin D3
CCNG2	Cyclin G2
CD	cluster of differentiation, Unterscheidungsgruppen
CD69	CD69 molecule
CDC	complement-dependent cytotoxicity, Komplement-abhängige Zytotoxizität
CDC27	cell division cycle 27 homolog (S. cerevisiae)
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase 4
CDK6	Cyclin-abhängige Kinase 6
cDNA	komplementäre DNA (DNS)
CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
COL4A2	collagen, type IV, alpha 2
CR	complete remission, Komplettremissionsrate
CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure (RNA)
CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)
CT	Computer-Tomographie

d	Tag
DCAF12	DDB1 and CUL4 associated factor 12
DKK2	dickkopf 2 homolog (<i>Xenopus laevis</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure, DNA
DUSP2	dual specificity phosphatase 2
DUSP5	dual specificity phosphatase 5
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGR1	early growth response 1
EGR2	early growth response 2
EGR3	early growth response 3
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ESRRG	estrogen-related receptor gamma
FAIM3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3
FAM65B	family with sequence similarity 65, member B
Fc	kristallisierbares Fragment, crystallisable fragment
FDG-PET	(18F)Fluor-desoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
FKS	Fötales Kälber Serum
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
G-CHOP	Obinutuzumab plus CHOP
G-FC	Obinutuzumab plus Fludarabin und Cyclophosphamid
GI	gastro-intestinal
h	Stunde
HIST1H1D	histone cluster 1, H1d
HIST1H2AG	histone cluster 1, H2AG
HIST1H2AJ	histone cluster 1, H2aj
HIST1H3A	histone cluster 1, H3a
HSPA1A/	heat shock 70kDa protein 1A
HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
IER2	immediate early response 2
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1
IgD	Immunglobulin D
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgVH	variablen Regionen der schweren Ketten der Immunglobuline
IKK	I κ B-Kinasen
IKZF2	IKAROS family zinc finger 2 (Helios)
IL21R	interleukin 21 receptor
ITPKB	inositol-trisphosphate 3-kinase B

IVT	<i>in vitro</i> Transkriptionsreaktion
JUN	jun proto-oncogene
kDa	kilo Dalton
KLHL36	kelch-like 36 (Drosophila)
LAP	Lymphadenopathie
LDH	Laktatdehydrogenase
LILRA4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 4
LPL	lipoprotein lipase
LY9	lymphocyte antigen 9
mAk	monoklonaler Antikörper
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)
MAP2	microtubule-associated protein 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBNL2	muscleblind-like splicing regulator 2
MIPI	M antle cell lymphoma I nternational P rognostic I ndex
MIR155HG	MIR155 host gene (non-protein coding)
MM	Multiples Myelom
mRNA	Messenger RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)
MZL	Mantelzelllymphom
NAB2	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2)
NF-kB	Nuclear-Factor-kB
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
NFKBID	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, delta
NFKBIE	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NIK	mitogen-activated protein 3 kinase 14 oder auch MAP3K14
NINJ1	ninjurin 1
nM	Nanomolar
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
OBI	Obinutuzumab
OCA2	oculocutaneous albinism II
ORR	overall response rate, Ansprechrare
OS	overall survival, Gesamtüberleben
OTUD1	OTU domain containing 1
PCD	direct induction of programmed cell death, direkte Induktion d. programmierten Zelltods
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide
PFS	progressionsfreies Überleben

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
PPIL4	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4
PPP2R4	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4
PRAD1	parathyroid adenoma 1
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
R-CVP	Rituximab, Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison
R-FC	Rituximab, Fludarabin, Cyclophosphamid
R-Hyper-CVAD	Rituximab, Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason
RAG	recombinase-activating genes
RB1	Retinoblastom-Proteins 1
RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
RFX3	regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)
RGS1	regulator of G-protein signaling 1
RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa
RHEBL1	Ras homolog enriched in brain like 1
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RTX	Rituximab
siRNA	Small interfering RNA
SLC34A3	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 3
SLC38A1	solute carrier family 38, member 1
SMG1	smg-1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (C. elegans)
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
SOX11	SRY (sex determining region Y)-box 11
SPRED1	sprouty-related, EVH1 domain containing 1
SPRED2	sprouty-related, EVH1 domain containing 2
SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila)
SZT	Stammzelltransplantation
TFEC	transcription factor EC
THRAP3	thyroid hormone receptor associated protein 3
TMEM107	transmembrane protein 107
TP63	tumor protein p63
TRIM2	tripartite motif containing 2
TTF	time to therapy failure
UBALD2	UBA-like domain containing 2
WNT3	wingless-type MMTV integration site family, member 3
ZBTB24	zinc finger and BTB domain containing 24
ZNS	zentrales Nervensystems

Eidesstattliche Versicherung

Heinrich, Daniel Alexander

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Gezielte molekulare Therapie des Mantelzelllymphoms -
Differentielle Regulierungsmuster der Anti-CD20-Antikörper Obinutuzumab und
Rituximab**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, den 22.11.2016

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand